

生命科学实验指南系列



Short Protocols in Cell Biology
精编细胞生物学实验指南

〔美〕 J. S. 博尼费斯农 等 著

章静波 方 瑾 王海杰 谭玉珍 主译

陈实平 陈誉华 张钦宪 陈克铨 主校

科 学 出 版 社

生命科学实验指南系列·典藏版

精编细胞生物学实验指南

Short Protocols in Cell Biology

〔美〕J. S. 博尼费斯农　等　著

章静波　方　瑾　王海杰　谭玉珍　主译
陈实平　陈誉华　张钦宪　陈克铨　主校

科 学 出 版 社
北 京

图字：01-2005-3954 号

内 容 简 介

“生命科学实验指南系列”图书均出自名家，包括众多从 Cold Spring Harbor Laboratory Press 和 John Wiley & Sons 等国际知名出版社引进的实验室必备工具书，是生命科学领域最先进、实用、权威的实验手册类优秀图书。该系列图书简单明了，囊括了全世界最著名的生物类实验室操作方法，无论是初学者还是需要深入研究的科研工作者都能从中获益。该系列图书在读者群中有较高的知名度和美誉度，特别是以《分子克隆实验指南》和《精编分子生物学实验指南》为代表，堪称经典，分别被喻为生命科学领域的“蓝宝书”和“红宝书”。现挑选其中的精品集结成典藏版。

原书名：Short Protocols in Cell Biology.

图书在版编目（CIP）数据

生命科学实验指南系列：典藏版/雷东锋等编著. —北京：科学出版社，2016
ISBN 978-7-03-047486-5
Ⅰ.①生… Ⅱ.①雷… Ⅲ. ①生命科学–实验–指南 Ⅳ.①Q1-0
中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 043878 号

责任编辑：王 静 李 悦
责任印制：张 伟 / 封面设计：刘新新

科学出版社 出版
北京东黄城根北街 16 号
邮政编码: 100717
http://www.sciencep.com
北京厚诚则铭印刷科技有限公司 印刷
科学出版社发行 各地新华书店经销
*
2016 年 7 月第 一 版 开本：787×1092 1/16
2016 年 7 月第一次印刷 印张：1310 1/2
字数：31 074 000
定价：4500.00 元
(如有印装质量问题，我社负责调换)

译校者名单

译　者　章静波（中国协和医科大学基础医学院）
董　敏（中国医学科学院基础医学研究所）
王艳辉（中国医学科学院基础医学研究所）
熊伟鹏（中国医学科学院基础医学研究所）
陈实平（中国医学科学院基础医学研究所）
冯　若（郑州大学医学院）
刘书漫（郑州大学医学院）
崔景彬（郑州大学医学院）
陈鲤翔（郑州大学医学院）
朱自强（中国医学科学院基础医学研究所）
刘　伟（中国医学科学院基础医学研究所）
王艾琳（北华大学医学院）
安倍莹（北华大学医学院）
曲　莉（北华大学医学院）
宋　艳（北华大学医学院）
赵永娟（中国医学科学院基础医学研究所）
方　瑾（中国医科大学基础医学院）
张惠丹（中国医科大学基础医学院）
赵伟东（中国医科大学基础医学院）
陈　澄（中国医科大学基础医学院）
王海杰（复旦大学上海医学院）
谭玉珍（复旦大学上海医学院）
王莎丽（中国医学科学院基础医学研究所）

审校者　陈克铨（中国协和医科大学基础医学院）
陈实平（中国医学科学院基础医学研究所）
章静波（中国协和医科大学基础医学院）
张钦宪（郑州大学医学院）
刘　伟（中国医学科学院基础医学研究所）
朱自强（中国医学科学院基础医学研究所）
方　瑾（中国医科大学基础医学院）
陈誉华（中国医科大学基础医学院）

译 者 序

细胞生物学的重要性及其在生命科学中的重要地位已被科学家们所公认。2002 年第 6916 期 *Nature*（《自然》）杂志的封面上赫然写着“Cell Biology is a Big Science”（细胞生物学是一门大学科）。为什么细胞生物学是个大学科呢？因为它是包括医学在内的一切生命学科的基础，它所研究的对象——细胞是生命的基础，无论单细胞生物还是多细胞生物，细胞的活动往往代表着或是牵动着整个机体的状况。因此早在 1925 年，细胞生物学研究的先行者 E. B. Wilson 便在他不朽的著作《细胞的发育与遗传》（*The Cell in Development and Heredity*）中指出“每一个生物学问题的关键最终必然从细胞中去寻求”（The key to every biological problem must finally be sought in the cell）。

自 1665 年 Robert Hooke 第一次发现细胞以来，人们对细胞的研究从未间断过，而且研究细胞的兴趣与日俱增。但是直到 20 世纪 50 年代，细胞生物学的研究还基本停留在细胞的形态、结构、组成的层面上。虽然在此期间细胞生理学、细胞遗传学、细胞化学等分支学科均已发展和建立起来，但只有在分子生物学兴起之后，才真正将细胞生物学抛向了一个更高的层面，诞生了细胞生物学。

如今，细胞生物学的研究范围更加广泛，研究层次更加深入，几乎涉及机体的一切生命现象，如生长、发育、变异（尤其是癌变）、疾病与死亡（尤其是细胞凋亡）等。同时，它又深入到分子、亚细胞的层面，将细胞与整体的研究相结合。为此，不少相关学科的研究者参与到细胞生物学的研究中来，无怪乎近年来不少诺贝尔奖授予了与细胞生物学研究相关的学科。例如，1999 年授予细胞内信号系统的研究，2001 年授予细胞周期的研究，2002 年授予细胞凋亡的研究，2003 年授予与细胞通道有关的研究，2006 年授予 RNA 干扰的研究等。

学科间的融合及相关科学家参与细胞生物学的研究不仅促进了细胞生物学的迅速发展，而且使得细胞生物学研究方法与技术也发生了革命性的变化。我们不但可以观察固定染色的细胞，还可以观察生活着的细胞；不但可以研究细胞内已存在的物质成分，还可以分析细胞内物质动态改变的代谢过程；不仅可以研究作为一个单独实体的细胞运动，还可以观察细胞器的运动；不但可以研究细胞间的相互作用，还可以研究细胞与周围环境的相互作用。所有这一切不仅使得细胞生物学成为一门大学科，而且几乎成为研究所有其他生命科学不可或缺的工具。美国 Wiley 出版社曾编著《最新细胞学实验方法汇编》（*Current Protocols in Cell Biology*，CPCB）。这部方法学工具书无疑具有大而全的特点，然而就实用性来说未免过于庞大，于是有了精编本。精编本实用而不烦琐，适合于所有从事细胞生物学以及将细胞生物学技术方法作为工具的其他生命学科的科研与教学人员，尤其是初涉细胞生物学研究的莘莘学子。

迄今，我国也已编著了不少关于细胞生物学实验技术方法指南的工具书，它们对于推动我国细胞生物学科研与教学发挥了重要作用，但就系统性来说与此书相比还有不小的差距，另外本书所描述的方案的步骤颇为详尽，操作之严密性也堪称典范。翻译此书

的意义不仅在于可以引进其中的方法技术，或许这种编写与著作模式也是适合“拿来主义”的。希望不久的将来我国也能编出适合我们自己国情的更好的细胞生物学方法学书籍来。

本书译者多为从事细胞生物学或相关学科的科研教学人员，他们对本书内容比较熟悉，相信译文能忠实反映出原文的本意。然而，鉴于本书内容新，有些技术方法尚未在国内运用，因此可能有理解原文不精确之处，甚至误译，谨希望读者在使用时及时指出并予以指导。我们将以适当方法及时予以纠正，免得谬种流传，误人子弟。这也是本书译者的共同心愿。

他山之石，可以攻玉。相信译本的出版能为推动我国细胞生物学及相关学科的发展起到应有的作用。

章静波

中国协和医科大学基础医学院

前　言

细胞生物学的研究体系日益扩大。要想领略这种扩展，途径之一便是去参加本领域的重要会议，诸如美国细胞生物学学会（American Society for Cell Biology）的年会。你可以悠闲地漫步于大厅的展板区，甚至于都不必驻足于某一版面，就可以深刻感受到细胞生物学范畴之辽阔。对于那些在过去一二十年间经常光顾这种展厅的人们来说，细胞生物学的这种动态态势以及这种爆发性的发展是毫不奇怪的——在愈来愈多的研究体系中只能是愈来愈多。以往展板区域主要由细胞的画面主宰，这些细胞都经由电子显微镜学家的固定（很呆板地），并且只是以黑白两色显示出来。虽然电子显微镜目前对于我们了解细胞构筑仍然有贡献，但新近展板区已出现一排排活细胞的电脑增晰视频影像（computer-enhanced video images），这些细胞均经过不完全活性染色才显示，诸如罗丹明红（rhodamine red）、荧光素绿（fluorescein green）以及被称作绿色荧光蛋白的特异绿色等。冰冻蚀刻的加入则以冷冻定帧法（freeze frame）来展现细胞。此外在视频影像间还散在有另一些展板，它们详细记录了众多细胞成分的分子特征。还有一些展板报道了用基因削减或基因敲除显示的有关它们功能的新近发现。正如罗盘的星点有其应有的位置一样，酵母、果蝇和蠕虫的遗传学研究兴旺于一方，而在细胞生物学基础研究和临床医学之间架设桥梁的研究也在另一方不断地涌现。

很显然，今天称自己为细胞生物学家的科学家乃是一个多学科群体，这种多学科性质隐藏着巨大的学术价值。那些曾经将研究学科分隔开来的边界如今已逐渐消失，细胞生物学家也已赞同没有哪一种单独的途径可以揭开细胞的奥秘。新技术和新技术学随着试验成真并肩而至，并且用作细胞生物学在本领域开拓的工具。正是细胞生物学的这一面目的变化以及其代表巨大挑战的方法学共同促成了《精编细胞生物学实验指南》的问世。本书要阐述的一个基本问题是，在细胞生物学领域里应在何处划出其边界。我们的决定是拒绝划出这种边界，因为它们完全是人为的，并且，糟糕的是，会产生反效果。相反，我们企图努力弥合该领域的多样性。本指南要包括那些对细胞生物学家仍有价值的“经典的”方法，也要提供旨在成为今后之经典的程序。

我们没有理由怀疑细胞生物学的研究领域随时都会很快地停滞。事实上，一名细胞生物学家之所以激励不已，部分地出于革新和新发现所带来的不间断的惊奇。为此，我们这一专业需要一些可靠的、便于使用的，而且还要反映出该领域扩展的实验方法学的资料。为了符合这一要求，我们收集了覆盖细胞生物学众多方面的一系列实验方案，虽然这一套方案还不完全，但可以认为它是一个“初学者工具箱”，包括有许许多多我们这一专业中最常用和必需的工具。

《精编细胞生物学实验指南》所提供的是发表于《最新细胞生物学实验方法汇编》（*Current Protocols in Cell Biology*，CPCB）中那些方法的精编本。我们的这一精编本是从原著“核心”手册以及季度新资料汇编抽取其精粹所构成的，包括 CPCB 新涵盖的主要方法，并一步一步地予以描述。为了适用于实验室，精编本的设计为流线型版式，

这与 CPCB 不同。这本精编本的内容也足够详细，研究人员可将其看作是独立的实验室指南。若想得到更多的信息和相关的讨论，我们推荐读者去参阅 CPCB 中的评述和详细的注释。

虽然掌握书中的技术可以使得读者从事细胞生物学及相关领域的研究，但无论是指南或是 CPCB，并不意图取代细胞生物学研究生水平的课程或是作为本领域中的完整教科书。此外我们极力主张读者们要向你身边那些富有经验的研究人员学习，以取得第一手经验。

如何使用本指南

结构

本指南中的主题是按章编排的，其中的方案插入每章各单元中。所谓"单元"，一般是描述一种方法，它们通常包括有一个或更多的方案，其中有材料、步骤和对每一技术的注释。在指南中，有关材料的描述顺序和结构与《最新细胞生物学实验方法汇编》不完全相同。各章均重新安排、重编序号，在某些情况里还有相互交融。各章中的单元也重新作了安排，但每章和每单元的题目基本上还是与 CPCB 相一致的。对于那些翻阅这两部实验指导的读者，当他们需要更多的解释和评述时，将会发现很容易在这两本书中找出相应的单元。

整个指南中所提到的许多试剂和步骤都是反复应用的，因此在各单元间我们广泛使用了相互参照，而不重复描述步骤。相互参照可确保那些冗长的和复杂的方案变得不那么烦琐，它只是描述准备新材料和分析结果的那些辅助步骤。某些描述常用技术和配制的单元（如凝胶电泳、离子交换层析、免疫印迹、放射自显术），则可与描述它们应用的其他单元相互参照。因此分离或鉴别蛋白条带时，便可相互参照第 7 章中（描述凝胶电泳的各个步骤）某个单元（也就是单元 7.1）。对于某些广泛使用的技术（如透析），读者又可参考附录 3。对于那些分子生物学和蛋白质生物学常用的方法，读者可参考《最新分子生物学实验方法汇编》（*Current Protocols in Molecular Biology*）和《最新蛋白质科学实验方法汇编》（*Current Protocols in Protein Science*）或它们的精编本。

本指南有四则附录，每一种方法中所用的试剂和溶液的配制及特别标注者可见附录 1，其余附录包括有用的量度和资料（附录 2）、常用的实验技术（附录 3）以及供应商的名号和地址（附录 4）。

方案

指南中的许多单元包括多种方案，每一种方案描述一系列步骤。基本方案出现于每一单元之前，通常是总体推荐的或是最普遍应用的方法。备择方案乃针对采用不同设备和试剂而达到相同结果时所选用者，其原材料来自不同的途径，或者终产物不同于基本方案。支持方案所描述的是进行基本方案或备择方案所需要的那些附加步骤，这些步骤独立于核心方案，因为它们或许可以在指南的另外地方用上，或是在与基本方案步骤不相关的一定时限中进行。

试剂和溶液

方案所要求的试剂均在步骤开始之前以材料目录一一列出。许多属于普通的储存液，另一些是常用的缓冲液和培养基，还有的则为特殊方案所专用的溶液。有标记符号（√）的材料系列的配方见于附录1。要特别注意的是，某些溶液虽然配方不同，但在不少单元里有相似的名称（如溶解缓冲液），因此需要针对配方准备试剂。为避免混乱，除了常用的缓冲液和溶液，如TH缓冲液和PBS之外，单元（要用到配方者）的附属编目可在附录1中每一种试剂名下找到。

注意：除非另有说明，在本指南中所有方案中均应使用去离子蒸馏水（或相当质量的水），并以此制备各种试剂和溶液。

设备

现代细胞生物学实验室中的各种标准设备列于附框中。这些设备在指南中被广泛应用。每一方案之前的材料目录只包括“特殊的”器材，也就是实验室中不一定备有的常规物件，或者是需要特别准备的物品。

标准的实验室设备

下列是现代细胞生物学实验室某些标准的设备——也就是在本指南中所广泛采用的。因此它们通常并不包括在每个具体的材料目录之中。我们并不意图列出每一个方案中每个步骤所需的所有材料，只是将那些在实验室不常准备的或是需要特别准备的设备列出。附录4提供了有关实验室设备供应商家的联系信息。

敷料品：棉头的和毛料的
高压锅
封袋机
天平：分析天平和制备天平
烧杯
桌布：塑料垫（包括蓝色小衬垫）
本生灯
离心机：低速（20 000r/min）冷冻、超速（20 000～80 000r/min）、低速大容量、台式，均装配有合适的转头和接头
离心管和瓶：各种大小的塑料、玻璃离心管和瓶夹子
圆锥形离心管：塑料和玻璃的
各种容器：用于洗凝胶和洗膜的各种塑料和玻璃的容器
玻片染色缸：玻璃的适用于25～75mm的载玻片
冷冻管：无菌的（如Nunc）
比色皿
有害生物废料箱和废料袋
生物安全柜：组织培养或层流超净台；过滤空气和维持气流形式，可保护因操作者而感染细胞或者因细胞而感染操作者
瓶子：玻璃和塑料的，带喷射器的
盖革计数器
干胶机
手套：一次性手套和热抗性手套
刻度量筒
加热器：恒温控制的，用于试管和微量离心管
血细胞计数器和/或电子细胞计数仪
匀浆器
加湿CO_2培养箱
冰桶
制冰机
显微镜浸油

实验室外衣
干燥器和干燥剂
干冰
电泳设备：琼脂糖和丙烯酰胺，最大的和小型的电源
胶片显影系统和暗室
过滤装置
镊子
分部收集器
冰箱：−20℃，−70℃，液氮
通风橱
显微镜玻璃载片：25～27mm，以及盖玻片
带相机的显微镜：立式、倒置、荧光、相差、解剖
微量滴定板阅读仪
研钵和研杵
烤箱：干燥用烤箱和微波炉
裁纸刀：大号
纸巾
石蜡膜
巴氏吸管和球囊
实验室玻璃用品
底片灯箱
液氮
冷冻干燥机
磁力搅拌器：带和不带有加热装置，附有搅拌棒
记号笔：包括防水记号笔、中国毛笔和荧光笔
微量离心机：Eppendorf 型，最大速率在12 000～14 000r/min
离心管：0.2ml，0.5ml，1.5ml，2.0ml
橡皮细胞擦或塑料细胞刮
橡皮塞子
安全眼罩
解剖刀和刀片
液体闪烁仪，β
剪刀
摇床：定轨和平台，室温或 37℃
分光光度计：可见光和 UV
真空旋转蒸发器
注射器和针头
胶带纸：不透光胶纸、电工黑胶带、高压锅胶带和 Time 胶带
试管：玻璃和塑料，不同大小规格，带有或不带有试管帽
PCR 热循环仪和试管
pH 计
pH 试纸
吸管：带刻度
移液管：可调试，0.5～10μl、10～200μl 和 200～1000μl
Polaroid 照相机或影视记录系统
电源：300V 用于聚丙烯酰胺凝胶，2000～3000V 适用于其他用途
架子：用于试管和微量离心管
射线保护屏：Lucite 或 Plexiglas
放射性液体或固体废料收集箱
冰箱：4℃
圈式铁架及配套铁圈
定时器
工具箱及常用工具
盘：塑料和玻璃的，不同大小规格
管子：橡皮和聚乙烯的
UV 灯：长波和短波
UV 透光仪
UV 透光塑料包装膜（如 Saran 保鲜膜）
真空干燥器
真空烤箱
涡旋混合器
组织捣碎机
可调温水浴箱
纯水系统
X 光片暗盒和增感屏

供应商

化学试剂、生物制品和设备的供应商名录在整个指南中均有列出。在某些情况下，名牌产品具有高质量或者它只有在商业中心有售。但也有这种情况，即限于本指南的作者经验，对有些品牌不甚了解。在后一种情况里，对于一个初级的细胞生物学实验者来说，在他们获得商业工具时，我们的推荐只能作为参考；对于有经验的研究人员则鼓励他们使用别的品牌以代替自己常用的品牌。在本指南中所提到的所有供应商的地址、电话号码、传真号码和 Web 网址均记载于附录 4。

参考文献

本精编指南只给出最基本的有限数目的参考文献，以此作为每个单元的背景。这些参考文献以缩写的形式列于每单元之后，而全部文献则列于本书之末的参考文献。所引证的特别参考文献目录，如图与表中者，也可在参考文献栏内找到。那些对方法的背景和应用想有更完全了解的读者可参阅《最新细胞生物学实验方法汇编》。

安全考虑

任何使用这些方案的研究人员均可能遇到下列有害的或潜在有害的物质：①放射性物质；②有毒化学物质和致癌的或致畸的物质；③致病的和感染性的生物制剂；④某些重组 DNA 结构。在某些单元里包括有关安全防范的陈述中，我们都强调本书使用者必须要小心谨慎，遵循良好的操作规范，要严格根据当地和国家有关规定处理所有的实验材料。

致谢

Wiley 出版社精编指南编辑部的同仁们支持和帮助我们将该课题荟萃在一起。他们是 Tom Downey，Elizabeth Harkins，Tuan Hoang，Scott Holmes，Nadine Kavanaugh，Susan Lieberman，Allen Rans，Liana Scaletter，Mary Keith Trawick 和 Kathy Morgan。我们特别感激我们的许多同事——包括我们自己实验室的同事以及全球所有有关机构和企业实验室的同事，是他们为本指南提供了材料，并和我们分享了他们的实验程序和经验。

推荐的基本读物

1. Alberts B.，Bray D.，Hopkin K.，Johonson A.，Lewis J.，Raff M.，Roberts K. and Walter P. 2003. Essential Cell Biology, 2nd ed. Garland Publishing, New York.

这是由《细胞的分子生物学》(*Molecular Biology of the Cell*) 的作者所撰写的一本细胞生物学导论。

2. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Watson, J. D. 2002. Molecular Biology of the Cell, 4th ed. Garland Publishing, New York.

3. Lodish H., Berk A., Zipursky L., Baltimore D. and Darnell, J. 2000 Molecular Cell Biology. 4th ed. W. H. Freeman and Company, New York.

这是两本完整和描述透彻的教科书，它们将生物化学、遗传学、结构生物学、传统细胞生物学有效地融会贯通起来，组成为一部现代分子和细胞生物学。

Juan S. Bonifacino, Mary Dasso,
Joe B. Harford, Jennifer Lippincott-
Schwartz, and Kenneth M. Yamada

目　　录

第1章　细胞培养

细胞生物学起源于17世纪下半叶由Robert Hooke提出的“细胞”概念。然而，直到20世纪中叶，细胞培养技术才逐渐发展起来。事实上，1998年定为第一个连续哺乳动物细胞系的五十周年。如今，细胞培养已成为细胞生物学一个密不可分的组成部分，人们已很难想像“培养前”时期的该领域的状况。由于细胞的维持和增殖已成为生物化学、生物物理学、遗传学、免疫学、生理学、分子生物学和神经科学的重要内容，因此，细胞培养也是细胞生物学延伸至相关学科的一条主要途径。所以，我们在《精编细胞生物学实验指南》第1章中介绍一些有关细胞培养的方法是十分恰当的。

细胞培养的直接目的是维持或扩增细胞数量，其最重要的考虑则是细胞活力。在标准化培养和实验条件下，细胞数目及活力测定极其重要。由于培养中活细胞增殖，这样可通过细胞传代达到细胞扩增以满足实验需要。为避免污染、恒温培养箱故障或实验者出现差错而造成细胞系丢失，细胞的冻存、储备、复苏提供了必要的安全保障。除细胞保种外，冻存细胞还可避免细胞衰老及遗传漂变。所以，第1章首先介绍细胞传代、细胞冻融和细胞数目及活力测定（单元1.1）。

细胞培养成功与否主要取决于培养基的选择。它至少要为细胞提供生长所必需的营养物质，以及各种所需的生长因子、稳定的pH和存活要求的渗透压。种类繁多的培养基的发展史对实验用的细胞类型影响显著，这缘于特定环境中增殖的细胞系始终被选择出来，而那些不能在此环境中生长的细胞被淘汰。因此，单元1.2集中介绍培养基的使用和标准、无血清培养基和选择性培养基，以及适于锚定非依赖性生长软琼脂的使用方法。

本章其他三个单元将介绍细胞培养的微生物污染问题。单元1.3讲解基本无菌技术和层流式超净台，那是防止污染的重要手段。单元1.4介绍过滤和加热消毒（如高压灭菌），以及消毒剂的使用。单元1.5介绍微生物（细菌、真菌和支原体）污染的检测。虽然解决这些污染问题最好的办法也许要先搞清前一单元中高压灭菌并忠实地遵循其规程，但是被污染细胞系的抢救性培养仍然是理所当然的，因此，以此为目的的单元1.5详细讨论了抗生素的应用。

当然，尚有一部分细胞生物学家并不认为哺乳动物细胞培养中出现真菌污染是件令人头痛的事情，相反的，把它当作一个有趣目标的科学家们则希望酵母菌增殖。单元1.6提供了如何进行酵母细胞培养基的配制和基本的培养方法学。

有关哺乳动物细胞培养的详尽资料，读者可直接查阅Freshney（1993a）的文献。

参考文献：Freshney，1993a

撰稿人：Joe B. Harford

单元 1.1　哺乳动物细胞培养的基本方法

原代细胞培养分为四个不同的生长期。第一期，细胞要适应体外环境；第二期，细胞经历一个指数生长期，约持续 30 代；第三期，细胞生长速度缓慢，形成一个渐进的较长的生长时期；最后，经 40～50 代之后，细胞开始衰老、死亡。有时人们希望通过细胞培养对某一特殊细胞系进行数月或数年的研究，因此培养物应被维持以保留细胞系的完整性。可将早期传代的细胞悬液等分进行冷冻，然后根据需要解冻再培养。冷冻培养可预防由遗传漂变引发的改变，还可避免由衰老或意外污染导致的细胞丢失。

多数情况下，细胞或组织必须经数日或数周培养获得足够数量才能进行分析，长期培养的维持要求严格遵守无菌条件，以避免污染和珍贵细胞系的丢失（单元 1.3）。

影响细胞生长的另一个重要因素是组织培养基的选择。现在已有多种不同配方的培养基可供利用，每个实验室必须确定哪种培养基最适合自己的要求。个别实验室还可以选择使用商品化的培养基或自己制备。前者一般无菌，即时可用。它们或为液体，或是呈粉末状，除能提供细胞生长所需营养物质外，还含有抑制微生物生长的抗生素、制霉菌素或两者兼有。培养基的制备详见单元 1.2。

当细胞生长至汇合后，必须对它们进行分离培养或传代。如果不对汇合的细胞进行传代，将导致细胞分裂指数降低，最终导致细胞死亡。单层贴壁细胞传代的第一步就是采用胰蛋白酶消化或机械法使细胞从原代培养的瓶壁上分离下来，此细胞悬液以 1×10^4～5×10^4 个/ml 的浓度重新接种至新的培养瓶中。次级培养需检测生长情况，定期换液，随后可能还要再次传代而形成三级培养等。传代时间视细胞生长速率和细胞系的不同而定。

警告：当使用人血、细胞或感染性因子时，必须遵守适当的生物安全规则。

注意：所有要与活细胞接触的液体和器皿都必须灭菌，并采用相应的无菌技术。

注意：除其他特殊情况外，所有细胞培养应在 37℃，5% CO_2 的恒温培养箱中进行。一些培养液（如 DMEM）可根据需要改变 CO_2 浓度，以保证 pH 维持在 7.4。

基本方案　单层细胞的胰酶消化和传代

材料（带√项见附录 1）

细胞的原代培养
√无 Ca^{2+}、Mg^{2+} 的 HBSS，37℃
√胰蛋白酶/EDTA 溶液，37℃
含有血清的完全培养基，如含 10%～15%（v/v）FBS 的 DMEM（完全的 DMEM-10 或 DMEM-15），37℃
无菌的巴氏移液管
37℃温盘或温箱
细胞培养用塑料或玻璃器皿，包括移液管、25cm² 培养瓶、60mm 培养皿，无菌

1. 用无菌的巴氏移液管吸尽原培养皿中的旧培养液，以少量 37℃，无 Ca^{2+}、Mg^{2+} 的 HBSS 洗单层贴壁细胞 1 或 2 次，以洗去抑制胰蛋白酶活性的胎牛血清。
2. 加足量的 37℃胰蛋白酶/EDTA 溶液，以覆盖住贴壁的细胞。
3. 培养皿置 37℃温盘上 1～2min，轻轻叩击平皿底部使细胞游离。于倒置显微镜下观察细胞变圆，并从附着面脱离。
4. 加 2ml 37℃的完全培养液，用移液管吸取细胞悬液吹打平皿底部 2 或 3 次，使底表面上残留的细胞脱落下来。一旦细胞呈单个分散状态，立即加入血清或含血清的培养液，进一步抑制胰酶的消化活性，因为它会对细胞产生损害作用。
5. 在每一个做了标记的新平皿或瓶中加入等体积的细胞悬液。或者用血细胞计数板计数细胞，调节细胞浓度约为 5×10^4 个/ml，然后将一定量的细胞接种到每一个培养皿或瓶中。
6. 每一瓶中补充 4ml 培养液，然后置于 37℃，5% CO_2 加湿培养箱中孵育。
7. 如有必要，3 或 4 天后，去除旧培养液，添加 37℃的新培养液至亚汇合的培养物中。
8. 当细胞汇合后，重复 1～7 步骤，进行传代。

备择方案　悬浮培养的细胞传代

1. 每 2～3 天后细胞生长密集，轻轻地将悬液培养的细胞从孵育箱中取出而不要摇动它，此时细胞沉降在瓶的底部。去掉 1/3 的旧液，加入等量的预热培养液。如果培养液体积小于 15ml，轻轻摇动培养瓶使细胞悬浮，然后水平放入培养箱。
2. 在不需要更换培养液的培养期内，只需摇动培养瓶使细胞悬浮，观察培养液颜色的变化，它直接显示细胞生长代谢状况。
3. 当细胞生长到 2.5×10^6 个/ml 时进行传代。从培养箱中取出培养瓶，摇动以重悬细胞。将一半的细胞悬液移入一个新培养瓶中，每瓶再补加预热的培养液 7～10ml，然后放入培养箱。

支持方案 1　人单层贴壁细胞的冻存

为了保存细胞，避免衰老，降低污染的风险，最大限度地减少遗传漂变，应用加入冷冻保护剂的方法可长期储存细胞系。

材料

平皿中处于对数生长期的单层细胞

完全培养基（如有补充物的 DMEM，见 DMEM 配方）

细胞冻存液，含 10%～20%（v/v）胎牛血清、5%～10% DMSO（v/v）的完全培养液，4℃

台式临床用离心机，配有 45°固定角度或水平式转头（如 Fisher Centrific 或 Clay Adams Dynac）

1. 胰蛋白酶消化对数生长期细胞（见基本方案，步骤1～4）。
2. 将细胞悬液转移至无菌的离心管中，加2ml含血清的完全培养液，室温下300～350g离心5min。
3. 去除上清，加1ml 4℃冻存液，重新悬浮细胞沉淀，再加入4ml 4℃的冻存液与细胞充分混匀，置冰上。
4. 用血细胞计数板计数细胞（见支持方案4）。用冻存液稀释细胞至终浓度为10^6～10^7个/ml。
5. 用移液管分别吸取1ml细胞悬液至2ml冻存管中，拧紧管帽，放置−70℃冰箱1h或过夜，然后转移到液氮罐冻存。

支持方案2　悬浮细胞的冻存

1. 将细胞悬液移入离心管，室温下300～350g离心10min。去上清，4℃冻存液重新悬浮细胞沉淀，调节浓度为10^6～10^7个/ml。
2. 将1ml等分细胞悬液转移至冷冻管，按单层培养细胞那样冻存。

支持方案3　人细胞系的解冻与复苏

当需要用冻存的细胞进行研究时，可迅速将之融化并高密度接种以期最佳地复苏。

警告：从液氮罐中提取冻存管或安瓿时，应穿防护服，尤其要戴绝热手套和防护眼罩。存放液氮罐的房间应通风良好。小心操作，提防液氮溅到皮肤上。

附加材料（见基本方案）

70%（v/v）乙醇

含20%胎牛血清的完全培养液（如有补充物的DMEM-20，见DMEM配方），37℃。

1. 从液氮罐中取出冻存管立即投入37℃水浴，并持续摇动直至液体融化（通常少于60s）。开盖前用70%乙醇擦拭管口。
2. 将融化了的细胞悬液移入无菌离心管，其中已预先装有2ml温热的、含20% FBS的完全培养基。室温下150～200g离心10min，去上清。
3. 用约1ml完全培养液/20% FBS轻轻悬浮细胞团块，然后接种到含一定量培养液的已做适当标记的平皿中。
4. 24h后观察并确认细胞已贴壁。5～7天后或培养液pH指示剂（如酚红）的颜色改变时，应更换培养液。用含20% FBS的培养液进行培养直至细胞系重新建立。

支持方案4　用血细胞计数板和台盼蓝染色法测定细胞数目及活性

在培养条件标准化和进行准确量化的实验中，应用血细胞计数板测定细胞数目是非

常重要的。

材料

70%（v/v）乙醇
细胞悬液
0.4%（w/v）台盼蓝染液或0.4%（w/v）用HBSS制备的苯胺黑染液（见HBSS配方）
血细胞计数板和盖玻片（如 Improved Neubauer，Baxter Scientific）
手握式计数器

1. 用70%乙醇清洗血细胞计数板表面及其盖玻片，自来水轻微润湿盖玻片的边缘，并将它紧贴在计数板的沟槽上，水平盖住银色计数区。
2. 对于单层贴壁生长的细胞，用胰蛋白酶消化法使细胞从壁表面分离下来（见基本方案，步骤1～4）。
3. 按需要将细胞稀释成均匀的悬液，细胞团块均需分散。
4. 用一支无菌的巴氏滴管取细胞悬液并将其转移至血细胞计数板计数室的边缘，用滴管头滴一滴在计数板盖玻片的下方，使之充盈到第二个计数室。
5. 开始计数前将计数板静置几分钟，吸去多余的液体。用100×显微镜观看到一个大方格状的中心区。用手握式计数器计数四角及中心小方格内的细胞数，其中压上线和压左线的细胞包含在内。重复计数另一小室的细胞。
6. 根据下列公式计算每毫升细胞数：

$$\text{细胞浓度}/(\text{个}/\text{ml}) = \text{每一个小方格的平均细胞数} \times \text{稀释倍数} \times 10^4$$

$$\text{总细胞数} = \text{个}/\text{ml} \times \text{细胞悬液总体积}$$

7. 在一小试管中依次加入0.5ml 0.4%台盼蓝染液、0.3ml HBSS和0.1ml细胞悬液，彻底混匀，静置5min，然后滴加在计数板上，测定活细胞数目。
8. 计数总细胞数和总活细胞数（未着色细胞数），按下列公式计算活细胞百分数：

$$\text{活细胞}\% = \frac{\text{未着色细胞数}}{\text{细胞总数}} \times 100$$

9. 用70%乙醇漂洗盖玻片及血细胞计数板，再以去离子水冲洗，风干存放。

支持方案5 细胞运输的准备

当单层贴壁细胞生长接近汇合状态、悬浮细胞生长到所需浓度时，用25cm² 培养瓶进行运输比较容易。首先倒掉瓶中培养液，装满新鲜培养液；悬浮细胞培养瓶则直接加满新鲜培养液。装满培养液可防止运输途中由于瓶子翻转而导致细胞变干。瓶盖要拧紧并用胶带封闭。将培养瓶密封在一个防漏的塑料袋或其他防漏容器内，这样可预防瓶子损坏后液体渗漏。再将这个一级容器放入二级隔离容器内，可避免运输途中温度急剧变化。外包装盒上还应粘贴生物危险品标签。一般地，培养物应在当天或过夜就到达目的地。

细胞还可以冷冻运送。从液氮罐中取出细胞冻存管，立即放入装有干冰的绝热容器内，防止细胞在运送过程中融化。

参考文献：Freshney，1993a；Lee，1991

撰稿人：Mary C. Phelan

单元 1.2　适于哺乳动物细胞的培养基

进行体外哺乳动物的细胞培养，其要点之一是在培养器皿中营造一种生理环境和特殊细胞类型的特异性反应。液态培养基至少要为细胞提供生长所需的营养物质、能量、恒定的 pH 和适当的渗透压。此外，培养的外环境，尤其隔水式 CO_2 培养箱，一定要达到稳定的温度和湿度，以防培养液蒸发，还要供给呼吸所需的 O_2 和维持培养液中碳酸氢盐缓冲系统的 CO_2。目前普遍使用的培养基一般由两部分组成：基础营养和补充成分。它们的组成可有相当大的差别。无论怎样，完全培养基的这两组成分都是细胞存活和增殖所不可缺少的。

注意： 用于细胞培养的所有溶液和培养液，均应使用反向渗透系统（如 Millipore 公司的 Milli-Q 系统）生产的纯净水配制；用后的培养器皿要用水冲洗，不要用消毒剂处理。

注意： 所有与活细胞接触的试剂与器械一定要灭菌，同时采用相应的无菌技术。

基本方案 1　制备含血清的培养基

许多细胞类型，尤其是成纤维细胞和转化细胞，其生存和增殖都要在基础培养基中添加 5%～20%（v/v）的血清。值得注意的是，如果培养的组织标本中有多种细胞类型，则成纤维细胞占有生长优势。此外，培养基还可有选择性地对抗某些类型细胞的增殖。除了正处于修复的细胞外，添加血清成分的培养基并不真正接近于细胞的生理环境。

材料

基础营养培养基，如 DMEM，Ham's F-12，RPMI1640（见表 A.1.2）
HEPES（如 Research Organics）
$NaHCO_3$（如 J. T. Baker）
谷氨酰胺和丙酮酸（如 Sigma）
青霉素 G 和硫酸链霉素（如 Sigma）
5mol/L NaOH（如 J. T. Baker）
血清（如 Hyclone，Sigma，UBI）
除菌滤器（如 Nalge Nunc，Corning，Gelman）
0.2μm 微孔滤器（如 Nalge Nunc，Corning，Gelman）

1. 用 0.8～0.9 倍体积的水溶解粉末状培养基，不断搅拌。

如果是商品化液体培养基，直接加青霉素、链霉素储存液，进入步骤 8。

2. 加一定量 HEPES 溶液，在终体积培养基中为 15mmol/L。
3. 按生产商推荐剂量添加 $NaHCO_3$（例如，5% CO_2 压力下，$NaHCO_3$ 的浓度为 14～36mmol/L）。
4. 加谷氨酰胺，终浓度为 0.01%（w/v）；加丙酮酸，终浓度为 0.01%（w/v）。
5. 加青霉素 G，终浓度为 100IU/ml；加硫酸链霉素，终浓度为 50μg/ml。
6. 5mol/L NaOH 溶液调节培养基 pH 至 7.4，补足水至终体积（1×）。如果需要，再调整 pH。
7. 用 0.2μm 微孔滤器过滤培养基，4℃避光存放。
8. 用时按需加入血清。

基本方案 2　制备血清减量或无血清培养基

目前，人们普遍认可单一类型细胞的最合乎生理的培养基是添加了蛋白质的、并且含有适当浓度的各种成分以及细胞外基质组分的限定培养基。

材料

基础营养培养基，如 DMEM，Ham's F-12，RPMI1640（见表 A.1.2）
营养物质：无机盐，氨基酸，维生素（如 Sigma）
微量元素（如 Sigma）
添加剂：生长因子和激素（如 Sigma，UBI，Becton Dickinson Labware），其他各种培养基成分（见表 1.2.1）

1. 凭经验先选用特别适合某种细胞生长的培养基，减少未限定培养基成分的浓度，直至细胞增殖能力降低，但活力仍较高。
2. 进行各种营养成分的不同浓度影响细胞增殖的实验。将已知的对至少一种细胞增殖有影响的营养成分，按以下分组进行测定：
   a. 能源（葡萄糖和谷氨酰胺）；
   b. 微量元素和电解质（Na^+、Cl^-、K^+、Ca^{2+}、Mg^{2+}、Cu^{2+}、Fe^{2+}、Se、$H_2PO_4^-$ 和 HCO_3^-）；
   c. 氨基酸（谷氨酰胺、胱氨酸、半胱氨酸、组氨酸）；
   d. 维生素（生物素、维生素 B_{12}）；
   e. 脂类和脂的前体物（油酸、亚油酸与脂肪酸结合的胆固醇-游离 BSA；与组分VBSA连接的未限定脂类；低密度脂蛋白、乙醇胺或磷酸乙醇胺）。

   确定大多数限制因子的最适浓度范围，并且确定中心范围的浓度；重复生长实验，依次确定并优化每种限制因素。
3. 降低未限定的添加成分的浓度，重复优化步骤。继续优化营养成分，直到其缩减的浓度得不到补偿。
4. 优化培养基中的生长因子、激素、转运蛋白及黏附因子等添加物质，可以单独试验，或者与培养基营养成分联合应用试验。

表 1.2.1　低浓度血清和无血清培养基成分[a]

成分	终浓度	储存浓度	推荐的供应商
不确定添加物			
血清	5%～20%(v/v)	100%(v/v)	Hyclone,Sigma,UBI
垂体提取物	5～100μg/ml	1～2mg/ml	UBI,Clonetics
条件培养基	5%～50%(v/v)	100%(v/v)	无商品化成品[b]
能源			
葡萄糖	1～4.5g/L	/	Sigma
谷氨酰胺	1～2mmol/L	/	Sigma
黏附因子			
胶原蛋白Ⅰ型	10～50μg/ml	3～4mg/ml	UBI,Sigma
纤黏素	1～10μg/ml	0.5～1mg/ml	Sigma
玻连蛋白	1～10μg/ml	0.5～1mg/ml	Sigma
激素			
胰岛素	1～10μg/ml	1mg/ml	Sigma,UBI
载体蛋白			
转铁蛋白	5～30μg/ml	1mg/ml	Sigma,UBI
BSA(无脂肪酸)	0.5～4mg/ml	50mg/ml	Bayer
微量元素			
硒,钠盐	1～20nmol/L	2μmol/L	Sigma
脂类及其前体物			
乙醇胺	1～20μmol/L	2mmol/L	Sigma
BSA 组分Ⅴ	0.05～5mg/ml	50mg/ml	Sigma
不饱和脂肪酸	1～10μg/ml	20～50mg/ml	Sigma
甾酮	1～20μg/ml	2～4mg/ml	Steraloids,Sigma
低密度脂蛋白	1～20μg/ml	1～2mg/ml	Chemicon International

a. 储存液需要过滤除菌，将粉末状的葡萄糖和谷氨酰胺（或冷冻的分装液需融化）加入到重组的粉末状培养基中。

b. 条件培养基必须由研究者按照实验目的选择细胞自行配制。

基本方案 3　HAT 选择培养基的制备

培养基可用来有意识地从混合细胞群体中筛选特定性质的哺乳动物细胞。

材料（带√项见附录 1）

脾细胞与骨髓瘤细胞融合后的杂种细胞（10∶1）

√含 10%胎牛血清（Hyclone）的 RD 培养基（Life Technologies）

4×10^{-5}mol/L 氨基喋呤（A 液；用 0.1mol/L NaOH 配制成 100 倍浓缩液）

1×10^{-5}mol/L 次黄嘌呤/1.6×10^{-3}mol/L 胸腺嘧啶脱氧核苷，双蒸水配制（HT 液；100 倍浓缩液）

HAT 培养基：RD/10% FBS/1×A 液/1× HT 液

96 孔培养板

1. 以 RD/10% FBS 培养液重悬脾细胞与骨髓瘤细胞融合物，其中骨髓瘤细胞浓度为 1×10^6 个/ml。在悬液中分别加入 0.01 倍体积的 A 液和 HT 液，配成 HAT 选择培养基。96 孔板每孔内分注 0.1ml 细胞悬液，然后置于湿润的 37℃，5% CO_2 培养箱内培养。
2. 每 2～3 天，从每孔内吸出一半的培养液，再补充新鲜的 HAT 培养基液。
3. 21 天后，筛选杂交瘤细胞上清液，检测有无目的抗体。
4. 逐渐撤出 HAT 培养液，换成 HT 培养液，在两周内再换成 RD/10% FBS 培养液。每隔 3 天用 HT 培养液替换一半的培养液，共 4 次；再每隔 3 天用 RD/10% FBS 替换一半培养液。

基本方案 4　转化细胞在软琼脂中的生长

恶性转化的细胞在许多方面不同于其相应的正常细胞，主要不同在于它们失去了接触抑制生长，获得永生性和在动物宿主体中形成肿瘤的能力。软琼脂培养可作为体外检测细胞转化和致瘤性的替代方法。

材料（带√项见附录 1）

√2%（w/v）琼脂（如 Difco）

基础营养培养基，如 DMEM，Ham's F-12 或 RPMI 1640（见表 A.1.2），含 24.6%和 20%（v/v）胎牛血清

单细胞悬液

12 孔培养板（如 Corning Costar）

15ml 聚碳酸酯锥形离心管（如 Sarstadt），灭菌

1. 对于每一组重复孔将 2.5ml 的 2%琼脂与 9.75ml 含 24.6%胎牛血清的培养液混合制成含 0.375%琼脂、20%胎牛血清的培养液，各取 2ml 分别注入 5 支 15ml 聚碳酸酯锥形离心管，45℃温浴。
2. 将管分开，分别在含 20% FBS，终容积为 0.5ml 的培养基中加入 50、100、200、500 和 1000 个细胞。再准备另一组试管为重复培养用。分别将各浓度细胞悬液与步骤 1 的琼脂混合，迅速注入 12 孔培养板，置于 37℃ 湿润的 CO_2 培养箱孵育，直至长出细胞集落。
3. 倒置相差显微镜下计数 5 次倍增后至少有 32 个细胞的集落数，计算集落形成率（形成集落的贴壁细胞百分数）。

支持方案 1　培养基中 pH 的调节

大多数细胞系增殖的最适 pH 为 7.4，当培养液逐渐变酸或变碱时，细胞的活力和增殖率将呈下降趋势。培养液必须缓冲细胞代谢葡萄糖和谷氨酰胺所产生的 CO_2 及乳酸。人们曾一度用碳酸氢盐、HCO_3^- 与空气中 CO_2 共同构成一个缓冲体系，碳酸氢盐

的低 pK_a(pK_a=6.1)在 pH7.4 左右产生微弱的缓冲效能。无毒缓冲剂,如 PIPES(pK_a=6.8),MOPS(pK_a=7.2),TES(N-tris[hydroxymethyl]methyl-2-aminoethanesulfonic acid,pK_a=7.5),HEPES(pK_a=7.55)在 pH6.0~8.0 范围内有效,更为科研工作者所常用。浓度为 10~25mmol/L 的 HEPES 是无血清培养基的标准缓冲体系,但它是额外添加的,不能替代碳酸氢盐和 CO_2 缓冲系统。培养基中常加酚红作为一种指示剂,它可提供肉眼可见的评估酸碱度的指标,随 pH 下降,颜色由红变黄:pH7.4 时呈红色,pH7.0 时呈橘红色,pH6.5 时呈黄色,当 pH 上升时又变为浅紫色(pH7.6)和紫红色(pH7.8)。当酚红从橘红色变为黄色,表明培养液乳酸堆积,要及时更换。

材料

不含 $NaHCO_3$ 或 HEPES 的粉末状培养基
HEPES(如 Research Organics)
$NaHCO_3$(如 J. T Baker)

1. 用水溶解粉末状培养基并轻轻搅拌。加入 HEPES(分子质量 238.3),使之终浓度为 15mmol/L,搅拌直至溶解。按照推荐浓度将 $NaHCO_3$ 加入到基础营养液中,搅拌备用。加其他培养基组分并调 pH 至 7.4(见基本方案 1)。
2. 培养基过滤除菌(见基本方案 1,步骤 7)。
3. 当完全培养基与温箱的温度、CO_2 浓度相平衡时,调整 pH。

支持方案 2 抗生素在培养基中的应用

培养基中添加的抗生素可消除微生物污染。最常见的污染是细菌、酵母、其他真菌和支原体污染,最普遍的污染途径是操作失误及培养基组分携菌。

材料

抗生素(见表 1.2.2)
无菌溶剂
0.2μm 微孔滤膜

表 1.2.2 常用的抗生素及其微生物靶

抗生素	浓度	微生物靶
两性霉素	2.5μg/ml	酵母、其他真菌
氨苄青霉素	100μg/ml	G^+、G^- 细菌
氯霉素	5μg/ml	G^- 细菌
庆大霉素	50μg/ml	G^+、G^- 细菌、支原体
卡那霉素	100μg/ml	G^+、G^- 细菌、支原体
青霉素 G	100IU/ml	G^+ 细菌
链霉素	100μg/ml	G^+、G^- 细菌
四环素	10μg/ml	G^+、G^- 细菌、支原体

1. 用适量无菌溶剂溶解抗生素，制成 100 倍或更高浓度的储存液。如果它的溶解度较高，用水或 PBS 溶解即可。如果抗生素不是无菌的，应使用 0.2μm 滤膜过滤。用前需在 4℃存放或在－20℃长期储存。
2. 使用前，立即将抗生素溶液加入到培养基中。

参考文献：Ham，1984

撰稿人：J. Denry Sato and Mikio Kan

单元 1.3　细胞培养的无菌技术

微生物无处不在，它们造成污染的可能性也处处存在。细胞培养成功操作最基本的要点是：任何将与细胞接触的物品必须是无菌的或没有污染的。要解决培养中的污染问题是一件烦琐的、令人沮丧的、没有成功把握的工作，因此，最好的策略就是防止微生物污染的发生。

基本方案 1　无菌技术

无菌技术在理论上是很简单的：阻止无菌的、未被污染的物质或物品与任何有菌的、被污染的物体相接触。成功的无菌技术的一个基本因素就是个人卫生。任何直接或间接地与培养相接触的物品必须无菌。理想化的情况是所有无菌操作都应该在一个层流式超净台中进行。如果是在一个敞开的空间进行无菌操作，火焰灭菌则通常是一种直接的、局部的灭菌方法。由于火焰形成的湍流会极大地打乱无菌气流，因此火焰灭菌法应尽量少用。

材料

抗菌肥皂
70％乙醇或其他适当的消毒剂
95％乙醇
洁净的袖口紧缩的实验室工作服
手术用乳胶手套
清洁宁静的工作间
盛有消毒剂的废物收集盘
本生灯或火苗引发灯（如 Touch-Matic，VWR）

1. 无菌操作前，束紧长发于脑后。用抗菌肥皂充分刷洗手和胳膊至少 2min。
2. 要依据培养的细胞或组织选择适当的工作服。为保证无毒、无菌条件，应穿洁净的、袖口紧闭的实验服，戴乳胶手套。无菌操作过程中，还应经常地用 70％乙醇消毒戴着手套的双手。

   在动物病毒培养工作中，要使用四级铵化合物。

3. 使用后的手套用高压消毒锅消毒，不可重复使用。专门用于培养的工作服穿过后要装进包装袋进行高压灭菌。装袋、高压灭菌（如果必要）和洗涤其他实验室工作服应在专设的房间内完成，或是送到有能力处理生物性污染的洗衣店清洗。
4. 脱掉防护手套后彻底冲洗双手。
5. 所有的无菌操作都应该在一个洁净的工作间内进行，不存在污浊的气流和穿堂风。层流式洁净间为无菌操作提供了一个最适的可控制环境。
6. 对将参与无菌操作的各种物品的工作空间要进行清洁。使用前后要用70％乙醇或其他适当的消毒剂处理工作面。
7. 无论怎样，当所用物品介入洁净工作间时都要用消毒剂处理。按照从洁净到污物的顺序合理安排各种物品，以防污染物件对清洁物件的交叉污染。
8. 任何细小的污染物应立即投入到消毒盘内。无菌工作完成后，及时清理各种较大的污物或其他要想处理的废弃物，并放置在指定的包装袋或盘内，然后高压灭菌。工作间参照步骤6进行消毒。
9. 用右手操作的人员，左手以约45°的角度持培养瓶（或尽可能地不使内容物流出），轻轻地移去瓶帽。切勿将瓶帽的任何部分碰触不洁物体（如手或工作台）。瓶口在本生灯火焰顶端缓慢通过，烧毁污染物。
10. 以一定的倾斜度静握培养瓶，用灭菌吸管缓慢地加入或吸出溶液，避免形成气泡。重复火焰灭菌，待瓶口略略冷却，盖上瓶帽。
11. 与相关物品接触的器械的关键部分浸泡于95％乙醇中。从乙醇中小心取出器械时，切勿碰触其洁净部位。待乙醇自然挥发后，持器械在喷灯火焰上通过，去除残留的乙醇。器械使用前，切勿碰触任何未经消毒的物件，冷却10s后再用。

    警告：95％乙醇是易燃品，乙醇容器要置于一定范围的安全处而远离明火。
12. 器械使用完毕后重新浸泡在乙醇消毒剂中，以备使用。
13. 手握接种环柄，于中间部位开始在本生灯火焰上前后移动烧灼金属圈，至出现橘红色，然后冷却至室温（约10s），待用。
14. 完成接种后，重新烧灼接种圈，清除残余的生物活性物质。冷却至室温，放置备用。

基本方案2　层流式超净台的使用

层流式通风橱（超净台）设备是一种物理防护设备，是防止从操作者或外环境中传播污染的初级屏障，还能保护实验室工作人员和环境免遭感染或有害物质的侵袭。水平层流式超净台的使用可以为处理干净的（也就是未污染的）材料（如过滤培养基）提供一个近似无菌的环境，但它决不能用于处理感染物质或有毒的化学物质。生物安全柜不仅为操作者和实验对象提供一个干净、安全的场所，在无毒的或无放射性化学物质存在的情况下，它还适用于接触低（或中）等风险生物因子的工作。

材料

70％乙醇或其他消毒剂

水平式层流超净台，有合格证明
棉拭子（如脱脂棉或纸巾）
触发式点火本生灯（如 Touch-o-Matic，VWR）

1. 彻底清洁层流式超净台的工作面，用 70%乙醇或其他消毒剂对工作台面及左右两侧进行消毒。不要向 HEPA 滤板格栅（背面）喷洒消毒剂。
2. 用前，打开吹风和照明系统，使柜内空气循环 10min。将实验特需物品放置到柜内，并于用前以 70%乙醇或其他消毒剂擦拭。
3. 使用超净台前彻底洗手，穿洁净的实验工作服，戴手术用手套，以防皮肤上的细小物质脱落产生污染。

在水平式超净台内工作应注意：

4a. 在台内的所有操作都应在距前挡板之后至少 4in* 的空间进行，避免快速运动而引起空气涡流。尽可能避免物品或双手从台内出出进进。

5a. 如果在超净台内需要火焰消毒，请使用触发式小火苗喷灯。但勿使喷灯长久燃烧。

6a. 工作完成后，从台内撤出所有物品，清理任何溅出的污物，用 70%乙醇或其他消毒剂擦拭台面；继续吹风 10min，然后关闭吹风和照明系统。

使用垂直式层流超净台应注意：

4b. 提升前观察窗，将实验所需物品放入台内，用 70%乙醇或其他消毒剂擦拭每件物品。按照从洁净到玷污的顺序排放物品。在台面的一侧放置干净的吸管、培养瓶和无菌培养液；另一侧放置废物盘、废弃的培养物和其他废弃物。

5b. 将观察窗提升距操作水平面约 8in。开始工作前，过滤台内空气保持吹风约 10min；工作中，所有操作均应在观察窗后至少 4in 的空间内进行，最大限度地减少快速运动或活动。保持观察窗开启大约 8in，这样物品可以轻易地进出。

6b. 如果需要直接火焰消毒，请使用电子点火或触发点火喷灯。请将喷灯摆放在工作空间后边。

7b. 操作完毕，密封所有污染物，以 70%乙醇或其他消毒剂擦拭工作面，尤其要仔细清除培养悬液或培养基污渍，它们有可能成为以后的污染源。清洗从台内取出的物品。继续吹风约 10min 以上，消除气溶胶，同时关闭荧光灯，打开紫外灯消毒至少 30min。

参考文献：Barkley and Richardson，1994；Chatigny，1986；Freshney，1993a
撰稿人：Rosalie J. Coté

单元 1.4　灭菌和过滤

消毒不是绝对的，但它确实有一定的作用。定期消毒如高压蒸汽消毒或干热消毒可能使某些生物只有 10^{-6} 或更少的机会逃逸。

* in=inch（es），英寸，1in=2.54cm

基本方案 1 液体的高压灭菌

高压消毒蒸锅通过湿热达到灭菌目的。湿热灭菌法的标准条件是：将物品置于121℃的饱和蒸汽中15min。一般地，它作为一种非破坏性的消毒方法，待消毒物品应满足以下原则：①对消毒过程中的温度和时间的耐受；②不受湿度影响；③经包装后准许暴露于蒸汽中；④如果是液体，应是亲水性的。

整个高压消毒过程所需的时间，是要保证待消毒物品置于121℃的饱和蒸汽中15min，并不是事先设置15min，高压锅就能自动在121℃运行15min。表1.4.1列举了在20in×20in×38in（51cm×51cm×97cm）高压消毒锅内各种物品的推荐消毒时间。

表 1.4.1 用 20in×20in×38in 消毒锅[a] 在 121℃ 条件下对各种物品进行消毒的运行时间表

容器	大小	体积/ml	最短时间/min[b]	最长时间/min[b]
试管	13mm×100mm	4～6	18	20
	16mm×125mm	5～10	18	20
	20mm×150mm	12～20	18	20
培养瓶	100ml	25～50	20	26
	250ml	75～100	24	28
	500ml	250	26	30
	1000ml	500	28	32
	2000ml	1000	30	32
培养基瓶	125ml	50	20	22
	500ml	250～500	30	32
空玻璃器皿	任何	任何	35	90

a. 蒸锅内尺寸(度量换算:51cm×51cm×97cm)。

b. 消毒时间表示的是实际高压消毒计时时间。按这些运作时间,容器内的物品将暴露于121℃ 15min,详细解释见正文。

材料

耐热容器和器皿（如硼化硅玻璃、高级不锈钢、无细胞毒性塑料）
待消毒液体
耐湿标签
纸或铝箔
高压消毒锅
高压消毒指示胶带
可高压消毒的废物盘

1. 用耐热容器盛其一半容量的液体进行高压蒸汽消毒，确保加热和冷却过程中沸腾的液体不能从容器内溢出。
2. 按设计的容积将液体加入到容器，待消毒，并用永久性墨水和耐湿标签标注液体的刻度。拧松容器开口盖子，不要使盖子过分拧紧，否则它将会阻碍适当的压力/蒸汽

交换。用纸或铝箔包裹棉花塞，扎紧并固定在瓶口，这样可防止在高压消毒锅放气过快时塞子被带出。
3. 在每一个物品或包装上面粘贴一条高压消毒指示胶带，它可直观地显示该物品是否已经消毒。
4. 将大小、体积和容器形状近似的物品装入高压消毒蒸锅，并将所有盛有可进行蒸汽消毒液体的容器放入高压消毒锅内的可高压消毒的废物盘内，关闭并锁上蒸锅门。
5. 设置液体消毒或缓慢排气控制系统。选择并设置时间控制系统（见表 1.4.1），启动运行直至完成。

   绝对灭菌是不可能的；选择时间和温度的目的是要杀灭 90%的微生物。

6. 只有当蒸锅压力指示表显示 0 lb/in^2（100℃或更低）时，才能打开蒸锅门。

   警告：开门时，不要站在排放蒸汽的通道上。

7. 待液体停止沸腾，移出瓶子或容器。

   警告：即使是轻微的碰撞，过热的液体也容易产生猛烈的沸腾，造成实验室人员的严重烫伤。

8. 将消毒物品放置在相对干净的地方，冷却至周围环境或其他指定的温度，勿将物品置于过度通风处。

备择方案　干燥物品的高压消毒

热稳定型干燥物体（包括不锈钢器械、玻璃器皿、纤维品和塑料器皿），只要其各个表面都能接触到 121℃的饱和蒸汽，均可经高压消毒达到有效的灭菌效果。

附加材料（见基本方案 1）

待高压消毒物品
耐热浅容器

1. 在一个浅的、耐热容器内松散放置小型待消毒物品。用纸或铝箔覆盖此外层容器开口。如果该容器配有自己的盖子，则轻轻盖上，以便蒸汽和压力能轻易穿透。在给稍大的瓶子或培养瓶等加盖盖子时（如螺帽），勿拧太紧以便压力气流穿入。
2. 用永久性墨水和耐湿标签给各种物品和包装编号，标注它们的容量，以此作为可视性标准，每一件物品或包装上粘贴一条高压消毒指示胶带，显示物品的消毒过程。
3. 如有需要，可在外部容器内或每一个单独物品内加少量去离子水或蒸馏水，从而保证有效灭菌的适当湿度。
4. 在蒸锅内要合理排列各种物品，避免密度过大影响消毒。如有可能，可将物品倒立放置，让冷却的、较重的气体容易流出（例如，将空瓶或培养瓶侧放，不要竖立）。
5. 设置消毒蒸锅快速排放气体程序，选择并设置消毒时间（见表 1.4.1），启动程序至完成。
6. 当气压表显示 0 lb/in^2（100℃或更低）时，打开门，取出消毒物品。

   警告：开门时，切勿站在蒸汽排放的通道上。

基本方案2　干热灭菌和清除热原法

干热灭菌法适用于能耐受140～180℃高温的物质组分，以达到有效的灭菌，它广泛用于实验室玻璃器皿和不锈钢器械的消毒，以及消毒非水溶性和热稳定性液体，如矿物油。对于耐热物质，清除热原法则是在干热灭菌箱内温度达220～350℃下进行的灭菌。

表1.4.2　干热灭菌时间-温度关系

炉温/℃	灭菌时间/h[a]	炉温/℃	灭菌时间/h[a]
180	0.5	150	2.5
170	1.0	140	3.0
160	2.0		

a. 灭菌时间指的是物品到达指定温度后的消毒时间，并不包括加热时间。

材料

待消毒物品
盛放小件物品的耐热容器（硼化硅玻璃或不锈钢）
铝箔
耐热标签或胶带
干热指示胶带
实验室用干热灭菌箱（灭菌温度为140～180℃；清除耐热原温度为220～350℃）

1. 在耐热容器内放置小件待消毒物品；用铝箔密封较大容器或其他没有单独盖子的物品的开口。用永久性墨水和耐热标签对每件物品或包装进行标注，并在它们的表面粘贴干热灭菌指示胶带。
2. 在箱内松散排放各种物品，避免过密而影响对物件的热渗透。拧紧箱门，选择灭菌温度和时间（见表1.4.2的总原则），启动灭菌程序至完成。
3. 关闭加热系统，待各种物品温度降至室温后，从箱内取出。

基本方案3　消毒剂的应用：70％乙醇

乙醇广泛用于实验台或层流式超净台的消毒。乙醇对营养型细菌和真菌细胞的杀灭效果好，但对细菌芽孢活性的杀灭完全无效。乙醇适于喷洒或擦拭，但不推荐大量使用。乙醇是易燃品。不推荐用70％的乙醇处理废物盘或生物安全柜中废液缸内的生物废弃物。

材料

100％变性乙醇

耐乙醇喷洒型储存容器

1. 300ml 去离子水或蒸馏水中加 700ml 100%变性乙醇，搅拌混匀。在一密闭容器内存放工作液，以防蒸发。
2. 对于实验台或层流式工作台：在工作面上来回喷洒足量的乙醇溶液，确保整个区域都湿润。待消毒剂与工作面接触 10min 以上，用纸巾吸去多余液体。
3. 对于其他物品（如培养基瓶、培养瓶）：用乙醇溶液浸湿手巾（粗棉布或纸巾），彻底擦拭物品，当心不要让液体进入到螺帽的螺纹或其他容器的封盖里。待消毒剂在物品表面停留 3～5min 后，用手巾擦去多余的液体。

溶液的过滤除菌

许多用于细胞培养的溶液中含有一种或多种对热不稳定的成分（如抗生素），或几种成分构成的体系（如磷酸盐缓冲体系），如果将它们进行高压蒸汽消毒，则会生成有毒的沉淀物。因此，使用膜滤器对这些溶液进行冷消毒是最普遍的方法。

0.2μm 微孔滤膜适于一般情况灭菌；然而，一些环境应激细菌（如假单胞菌属 SP.）及支原体就能够通过这类滤膜。为了能最大限度地去除这些组织培养中常见的微生物污染，就要采用孔径为 0.1μm 微孔滤膜过滤培养液和血清。滤膜制造商可提供不同类型的滤膜。就细胞培养而言，醋酸纤维素或硝酸纤维素滤膜通常用于过滤诸如培养液和缓冲液等液体。值得注意的是，在使用前应该用热的去离子水冲洗薄膜，清除其中可能引起细胞毒性的可溶性物质。尼龙膜含较少的表面活化剂或润湿剂等可溶性物质；聚乙烯磺酸膜中含少量的可溶性物质并很少与蛋白质结合。

预先除菌的、随时可用的一次性过滤系统省时省力，消除了早期过滤方法存在的隐患。过滤器范围广，从小（≤10ml）到大（≥20L），体积不等。这种一次性的系统也适用于真空或正压过滤。许多生产商根据细胞培养的使用要求，设计出特殊的过滤系统：灭菌膜、滤套和接收瓶，并确保它们无细胞毒、无致热原。对于制备培养基，使用无细胞毒的醋酸/硝酸纤维素滤膜，或其他相似的滤膜，以及食品级硅管。

注意： 所有程序均遵循无菌技术（单元 1.3）。

基本方案 4　真空过滤

原为清洁的制备物，即透明、无特殊碎片、无蛋白质颗粒的溶液，直接采用过滤灭菌较为容易。如果溶液中含有大量特殊的颗粒，就需要先离心和/或粗过滤及用大孔径的滤膜过滤，然后再使用 0.2μm 滤膜。

材料

待过滤溶液

47mm 漏斗/1～2L 真空滤器组件（任选；如 Kontes，Millipore）

47mm 玻璃纤维粗滤器（任选；Gelman，Millipore）

47mm 膜滤器（任选；0.45μm 和 0.2μm 孔径）
一次性的，除菌滤器物件（如 Corning，Nalgene）包括：
过滤漏斗、滤套和 0.2μm 滤膜
漏斗盖
可移动的接收瓶及瓶盖
防倒流的管口接头
未灭菌的粗预滤器（大多数制造商）
真空泵

1. 如果待消毒的溶液是悬浊液或有肉眼可见的沉淀，1000*g* 离心 30min，去除沉淀。或者通过一系列的预过滤，使用漏斗/滤器组件处理溶液：粗过滤，然后用 0.45μm 滤膜，最后用 0.2μm 滤膜。
2. 从塑料袋中取出一次性无菌滤器、管口接头和单独包装的灭菌接收瓶。
3. 检查确定滤器漏斗是否与接收瓶紧密连接，如有必要请拧紧。连接管口接头到滤器漏斗颈部上真空舱的侧面，将真空管与接头相连。
4. 垂直放置滤器并提供支撑，避免漏斗装满液体时头重脚轻，导致滤器倾斜。摘掉漏斗盖，缓慢注入溶液（如有必要请事先离心或预过滤）。使用小量真空——5 磅/英寸^2 重力（psig*），避免蛋白质溶液产生过多的泡沫。
5. 过滤完毕，关闭真空泵。仔细将过滤系统从真空管上拆卸下来。采用无菌技术，将漏斗从接收瓶上移开，并用螺旋盖密封瓶口。

基本方案 5　小体积非水溶性液体的正压过滤

二甲基亚砜（DMSO）通常用作培养细胞液氮冻存时的低温保护剂。该试剂在高压蒸汽条件下不稳定，必须用耐 DMSO 注射器型滤器系统进行除菌。

材料

二甲基亚砜（DMSO）
25ml 玻璃注射器，带路厄锁（Luer-lok）紧接头
无菌注射滤器；直径为 25mm 的尼龙膜，0.2μm 孔径，聚丙醇塑料套
层流式超净台
灭菌的棕色玻璃储存管，螺旋帽，其衬里涂有聚四氟乙烯（泰氟隆，PTFE）

1. 25ml 注射器装满去离子水或蒸馏水。
2. 无菌条件下拆掉灭菌滤器的外包装，切勿碰触滤器的出水口。将注射器与滤器的进水口连接，拧紧。
3. 给注射器施加稳定压力，但不要过大，使其中的去离子水缓慢经过滤器注入到一个

* psig=pounds per square inch gravity，磅/英寸^2

废液容器内。

4. 小心地将滤器与注射器分离，放置在层流式洁净台的工作面上，保持出水口端朝上（也就是不要碰触台表面）。注射器吸取约 25ml DMSO，再与滤器连接。
5. 稳稳加压，但不要太用力，将第一次的 DMSO 缓缓地注入到一个废液容器中。
6. 以注射器再吸取约 25ml DMSO，过滤，滤液注入到棕色玻璃瓶内，立即拧紧 PTFE 螺旋帽瓶盖。室温下可存放 6～9 个月。

参考文献：Barkley and Richardson，1994；Block，1983；Brock，1983；Millipore，1993；Perkins，1976；U. S. Pharmacopeial Convention，1995；Vesley and Lauer，1986
撰稿人：Rosalie J. Coté

单元 1.5　确定和控制细胞培养的微生物污染

细菌和真菌污染可以通过在有利于细菌、真菌和酵母生长的条件下直接培养而检测。同样地，检测支原体污染的直接方法也可用微生物培养基促使支原体繁殖，再进行筛查。微生物污染能够通过使用抗生素而得到控制。微生物污染的检测应列入细胞培养质量控制的常规项目。微生物和支原体的检测还应在刚收到细胞系时，为细胞库主库和运作库以及保种所准备的安瓿样本进行检查。这种检查还可以在任何时候、怀疑有污染、没有抗生素存在而细胞已经培养了几个星期的情况下进行。

注意：为了避免细胞系不小心被污染，细菌、真菌的检测应在不从事细胞培养的实验室中进行。

基本方案 1　细菌和真菌污染的检测

本方案所介绍的培养基和方法适用于检测造成细胞系污染的大多数细菌和真菌。

材料

细菌检测用培养基：如心脑浸出液（BBL，Difco），液体巯基磺酸培养基（BBL，Difco），HTYE 肉汤（见配方），大豆/酪蛋白消化肉汤 USP（如胰酶解酪蛋白大豆肉汤，BBL；胰胨大豆肉汤，Difco），或胰酶解酪蛋白大豆琼脂（BBL）。
菌丝体和酵母检测用培养基：如 Sabouraud 葡萄糖琼脂（改良的 Emmon；BBL，Difco）或 YM 琼脂（Difco）
无菌，去纤维蛋白羊血（如 Colorado 血清，Waltz Farm）
细胞培养检测样本
无抗生素培养基（可选）
电导计（可以不与实验室纯化水系统合用）（Corning model 162 或同类仪器）
50℃水浴锅
16mm×125mm 硼化硅试管，螺帽内有橡胶垫圈
100mm×15mm 一次性无菌塑料平皿
半自动重复加样器，5～24ml（可选）

培养箱：26℃，35～37℃，37℃含 5% CO_2

对于液体（肉汤）培养基

1a. 在电阻为 10MΩ（或更高）的蒸馏水或去离子水中，依照生产商的操作指南或所提供的处方，配制心脑浸出液、HTYE 肉汤、黄豆/酪蛋白肉汤和液体巯基磺酸培养基，加热至大约 50℃，不断搅拌溶解各种组分。对于任何含有琼脂成分的培养基（如液体磺酸培养基），应煮沸并持续搅拌至充分溶解。

2a. 在 16mm×125mm 硼化硅试管中分装培养基，液体巯基磺酸培养基，10ml/管；其他培养基，5ml/管。

3a. 松松地拧上螺帽，用线拴牢，防止高压蒸汽消毒时液体逸出；但不能拧紧螺帽，这样可保证消毒过程中试管内气压交换。

4a. 在缓慢排气或液体循环程序中，121℃高压蒸汽灭菌试管 15min（见表 1.4.1）。

5a. 灭菌过程结束/或当蒸锅压力表指在正常大气压时，立即取出装有培养基的试管，冷却至室温，不要放置在气流强烈或温度起伏较快的地方。

6a. 当培养基试管达到室温状态，完全拧紧螺帽，4～8℃储存，以进行质量控制检测或备用（保质期 6～9 个月）。

制备琼脂平板

1b. 在电阻为 10MΩ（或更高）的蒸馏水或去离子水中，依照生产商提供的处方制备胰酶解酪蛋白大豆琼脂、Sabouraud 葡萄糖琼脂和 YM 琼脂。用一个至少两倍于培养基的耐高压容器盛放培养基（如用 2L 锥形烧瓶 Erlenmeyer 盛 1L 培养基），可避免高压消毒过程中液体溢出。

2b. 在缓慢排气或液体循环程序中，121℃高压蒸汽灭菌培养基 15min（见表 1.4.1）。

3b. 于近 50℃水浴冷却。

4b. 无菌条件下，以 50ml/L(5%）比例，将去纤维蛋白羊血加入到胰酶解酪蛋白大豆琼脂中。

5b. 无菌条件下，在 100mm×15mm 一次性无菌塑料平皿中分装培养基，24ml/皿。

6b. 10～20 个平板叠放在一起，室温冷却凝固，过夜。然后装入有通气孔的塑料袋内，4～8℃储存，质控检查后备用（保质期 12 周）。

7a. 冷冻安瓿的样品制备：用 1 支 1ml 血清学吸管从准备细胞冷冻的各个管中取细胞悬液约 5%，均匀混合。

7b. 细胞培养瓶：用低倍倒置显微镜，最好是相差显微镜，逐一检查培养瓶，观察细胞生长或形态是否有异常。无菌条件下从可疑污染的培养液中吸取 5ml 培养上清液做进一步检查测试。隔离可疑的培养物或器皿，确保它们不与洁净物品产生交叉污染。

8. 湿封待测的样本，然后在油镜（放大率≥1000×）下检查。

9. 如果培养液中含抗生素，在进行培养基微生物检测之前洗涤细胞。2000*g* 离心 20min（室温或 4～8℃），去掉上清液，用不含抗生素的培养基重悬沉淀。如此步骤需重复 3 次，彻底清除微量的抗生素，以免干扰微生物培养。

10. 每一份检测样品，取 0.3ml 细胞悬液进行接种：
   2 管心脑浸出液
   2 管液体巯基磺酸培养基
   2 管 HTYE 肉汤
   2 管大豆/酪蛋白消化肉汤
   2 盘胰酶解酪蛋白大豆琼脂，含 5%羊血
   2 盘 Sabouraud 葡萄糖琼脂，改良的 Emmon 培养基
   2 盘 YM 琼脂
11. 一盘胰酶解酪蛋白大豆琼脂（含 5%羊血）于 37℃有氧条件下孵育，另一盘于 37℃，5% CO_2 条件下孵育。
12. 其他种类的培养基样品一半在 26℃，一半在 35～37℃条件下孵育。
13. 每天检查接种物，共 14 天。
14. 污染检测呈阳性者，则培养细胞用的制备物要进行高压消毒，然后废弃。

基本方案 2　直接培养法检测支原体污染

该方案介绍了利用促进支原体增殖的微生物培养基来筛查支原体，直接检测支原体污染，需 35 天。

这对于检测低水平支原体污染是必需的，否则将有可能出现假阴性。

材料（带√项见附录 1）

待测细胞系
√ 支原体肉汤培养基：16mm×125mm 螺口试管内含 6ml 培养基
√ 支原体琼脂平板：60mm×15mm 平皿中铺 10ml 固体培养基
37℃培养箱：一台是无 CO_2 培养箱，另一台是含 5%（v/v）CO_2 的湿润培养箱
100～300×的倒置显微镜

1a. 对于贴壁生长的细胞：选择即将汇合，并且近 3 天内没有更换培养液的细胞，去掉大部分培养液，仅剩 3～5ml，用一只灭菌的细胞刮刮取一部分单层细胞，使之悬浮于培养液中。
1b. 对于悬浮生长的细胞：直接从近 3 天内没有补充新鲜培养基或没有进行换液的细胞中提取检测样品；或是从复苏的细胞悬液中提取检测样品。
2. 在一支 16mm×125mm 螺口试管内预先装有 6ml 支原体液体培养基，加 1.0ml 测试细胞培养悬液，孵育。也可将 0.1ml 测试样品加到一个 60mm×15mm 支原体琼脂板上孵育。
3. 肉汤培养基试管在 37℃有氧条件下孵育；琼脂板在 37℃ 5% CO_2 湿润培养箱内孵育。每天观察培养液浊度和/或 pH 的变化情况（如果变碱，培养基更红；如果变酸，则更黄）。
4. 孵育 5～7 天及 10～14 天后，分别从肉汤培养基中取 0.1ml 样品接种到新的支原体

琼脂板上。将这些板按照步骤 3 进行孵育。

5. 使用 100～300× 倒置显微镜，每周检查琼脂板，至少 3 周，直至长出支原体集落(见图 1.5.1)。
6. 为确定是否是支原体集落，可将一小块（约 $1cm^2$）可疑物转接到支原体肉汤培养基中，孵育 14 天，按照步骤 3 进行观察。

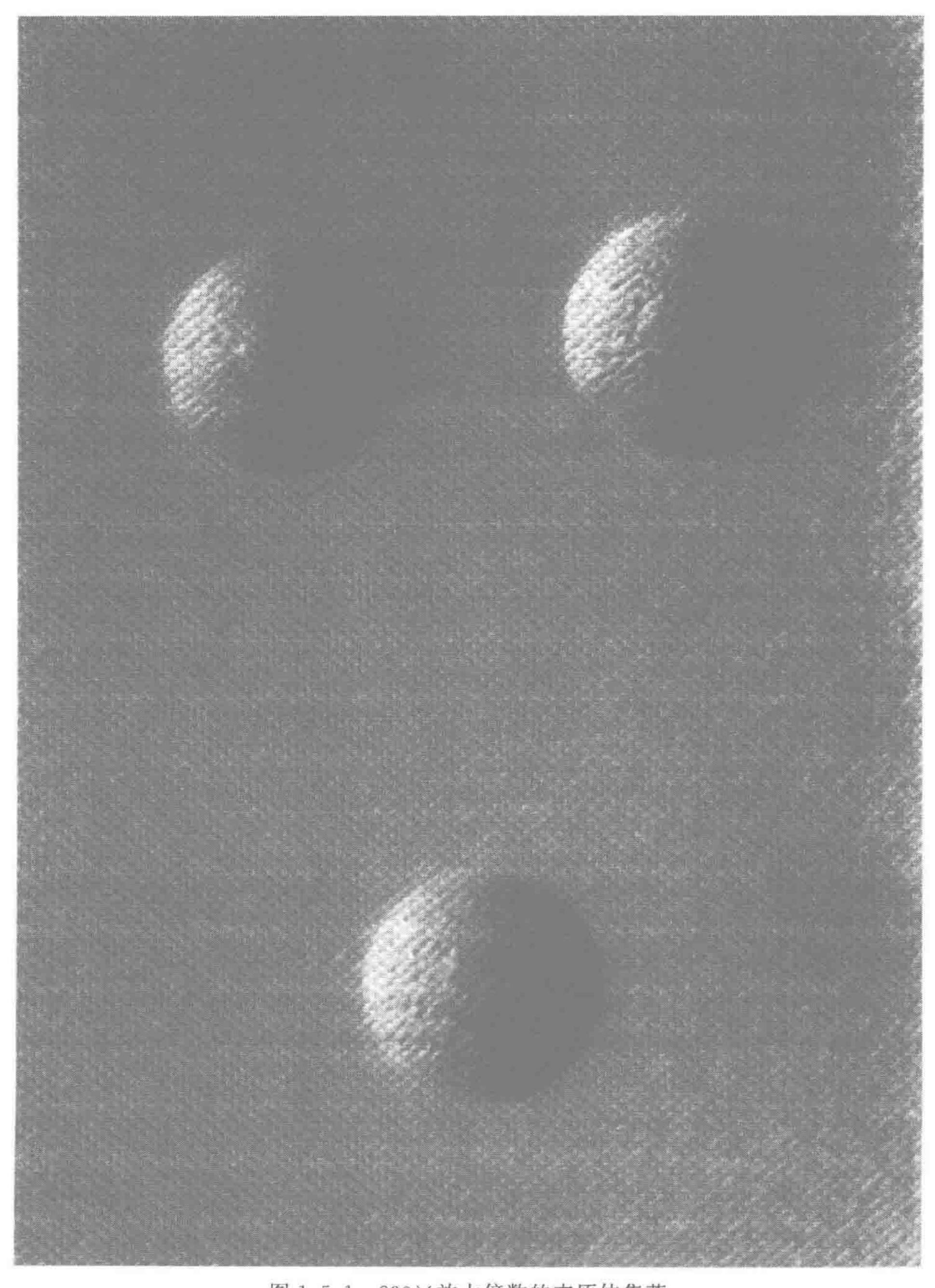


图 1.5.1　230× 放大倍数的支原体集落

照片由 Bio-Whittaker 有限公司的 Siegel W. 提供

基本方案 3　应用抗生素控制微生物污染

处理被污染的细胞最好的方法是进行高压消毒。如果有必要抢救被污染的细胞，那么使用抗生素则是势在必行的。

材料

被污染的细胞

适当的无菌抗生素储存液（见表 1.5.1）

1. 立即隔离被污染的细胞，防止造成实验室内可能的交叉污染。
2. 鉴定微生物污染的类型：细菌、真菌或支原体（见基本方案 1 和 2）。

3a. 对于明确的污染：从表 1.5.1 中选择适当的抗生素，制备并过滤储存液。

3b. 对于未知的细菌污染：制备并过滤以下抗生素 10×浓缩液：

2500U/ml 青霉素

2.5mg/ml 硫酸链霉素

2.5mg/ml 新霉素

25U/ml　杆菌肽

4a. 对于单层贴壁细胞：吸去污染液，加入含抗生素的新鲜培养液。在新鲜培养液中加入特异抗生素储存液（步骤 3a），制成适当浓度的工作液（见表 1.5.1），即 1 体积 10×抗生素组分（步骤 3b），加 9 体积新鲜培养液。

4b. 对于悬浮细胞：125g 离心 10min，去除上清，按照步骤 4a 的方法，用新鲜培养液重悬细胞。

5. 每 3～5 天补充抗生素溶液维持工作液浓度（表 1.5.1 中 37℃条件下稳定时间），继续作用 14 天。

表 1.5.1　抗生素[a]

有机体	抗生素	溶剂	稳定性(37℃)/天	工作浓度
细菌	氨苄青霉素	H_2O	3	100mg/L
（G^+菌）	红霉素	2mol/L HCl	3	100mg/L
	硫酸庆大霉素	H_2O	5	50 mg/L
	硫酸卡那霉素	H_2O	5	100 mg/L
	硫酸新霉素	H_2O	5	50 mg/L
	青霉素-G,钾盐	H_2O	3	10^5 U/L
	硫酸链霉素	H_2O	3	100mg/L
	盐酸四环素	H_2O	4	10 mg/L
真菌	两性霉素 B	DMSO;DMF[b]	3	2.5 mg/L
（霉菌和酵母）	制霉菌素	DMF	3	2.5×10^6 U/L
支原体	硫酸庆大霉素	H_2O	5	50mg/L

a. 所有抗生素溶液必须过滤除菌，短期内使用，如果 14 天后或传两代并没有消除污染，则要清理培养物。

b. 缩写：DMF，二甲基甲酰胺；DMSO，二甲基亚砜。

6. 救治期间经常进行镜下观察，检查是否有细胞毒性以及消除污染的情况。
7. 如果抗生素救治没有成功，立即对培养物进行高压消毒；如果污染被治愈，更换无抗生素的新鲜培养液。
8. 检测微生物和支原体污染（见基本方案 1 和 2）。

参考文献：Barnhart，1990；Budavari et al.，1996；Freshney，1993b；Hay et al.，1992；Sigma-Aldrich Co. 1998

撰稿人：Rosalie Coté

单元 1.6　酵母培养及培养基

正如在该手册和其他书籍中所描述的，酵母（*Saccharomyces*）是实验室研究最广泛的生物体之一，它已成为遗传和分子生物学方法的重要组成部分。现已构建了大量有实用特性的酵母株，其中多种菌株可从公共库获得，包括酵母遗传原种中心（YGSC；Rebecca Contopoulou，Curator；e-mail：ygsc305@violet. Berkeley. edu）或美国组织培养库（ATCC）。这些机构联系方式请查询因特网和附录 4。

培养酵母是相对简单的，并且使用的材料简便低廉。对于大多数营养物质，野生型酵母属于原养型，即它们有能力从无机盐中合成大部分代谢物，还能以碳源作为能量。然而大部分实验株携带基因突变，这就使得它们具有一种或多种代谢物营养缺陷，如氨基酸或核苷酸，这些物质必须从生长培养基中得到补充。这些营养突变体或标记物通常用于质粒的保持和其他遗传实验。

注意：除非有其他方面的提示，所有酵母细胞的孵育都是在 30℃ 条件下进行。

培养基的制备

酵母培养基可分为液体或固体。液体培养基无须解释；典型的固体培养基含 2%（w/v）Bacto 琼脂。其他类似的促凝剂也可以用于特殊情况。

液体培养基

液体培养基的制备除了不添加琼脂外，与固体培养基的制备方法相同（见以下介绍）。液体培养基要经过高压蒸汽灭菌或使用 0.22μm 滤膜过滤除菌。过滤除菌较快捷，并能减少任何培养基成分热失活的风险。可在普通瓶或培养瓶内制备液体培养基，如果是在生长瓶中制备，培养基的体积不能超过瓶容量的 1/5，这样在摇菌过程中可保持最大通气量。

固体培养基

选择锥形瓶或费氏烧瓶制备培养基，但最便于铺板的容器是 Fleaker（Corning）。热稳定成分在水中混合直至完全溶解（除琼脂，因其加入水中不溶解）。在高压灭菌前，往烧瓶或 Fleaker 中加一个磁力搅拌棒。培养基于 121℃、液体或缓慢排气程序下进行

高压灭菌，15psi*，15min。然后将容器放置在室温下的搅拌台进行搅拌直至温度冷却到60～65℃。或者也可将烧瓶或Fleaker置于55℃水浴锅。此时可加入已过滤灭菌的、对热敏感的成分。铺板前培养基应完全混匀，琼脂完全溶于培养基中。

大多数酵母培养基配方的pH介于5.5～7.0之间。如果制备偏酸性培养基，pH≤4.8时，要尽可能地避免对琼脂的高压灭菌，这是由于冷却时琼脂发生水解，不能形成凝胶。

铺板时应选择在极少有灰尘和气流的地方，用70%乙醇或其他消毒剂擦拭工作面。预先算好平皿的包装袋数量，仔细剪开包装袋的顶部（一般是15mm×100mm或15mm×95mm），翻转包装袋，滑出平皿，包装袋可以留着装铺好凝胶的培养皿。平皿底部要做好标记，翻转过来后每8盘一组。培养基冷却至55～60℃时，将其小心倒入平皿。操作时，一只手持Fleaker或烧瓶，另一只手提起上面7个平皿，在第八个平皿内倒入培养基。按此方法，提起上面6个平皿，在第七个平皿内倒培养基，依此类推。尽管最初倾倒培养基时操作不灵便，但它比一个一个平皿的倾倒方法快捷，占据空间较少。

1L培养基一般铺40～50块平皿。有时在倾倒时出现气泡，可采用将还处于融化状态下的琼脂迅速通过喷灯火焰的方法除掉。为了降低污染风险，要尽可能早地盖上平皿的盖子。琼脂变硬后（20～45min），翻转平皿，使盖子处于底部。室温下，自然干燥2～3天。由于易于凝集，酵母培养基在室温下干燥的时间长于细菌培养基。一旦干燥后，将平皿放入塑料袋内密封，室温储存或4℃储藏更长时间。大多数培养基可保存3个月以上；如若避免过度干燥和污染，能保存1年以上。有时还可在塑料袋上划出小裂纹，有助于平皿“呼吸”，这可能降低凝聚，但却可导致微生物污染。

限定与复合培养基

酵母培养基通常被称为限定或复合培养基。限定培养基由化学限定成分组成，如盐类、糖类和氨基酸。复合或丰富培养基包含添加的复合溶解产物或水解产物，如酵母抽提物或胨。就定义而论，含琼脂的培养基也被视为此类。

材料

制备培养基应该使用蒸馏水或去离子水，尽管某厂家的某一特殊成分通常不十分重要，但大部分原料都该采用高级的。酵母抽提物、胨、琼脂和酵母氮基质（YNB）都应该是Bacto牌，Difco经销。Difco产品由多家科学销售商经营。

当某种酵母培养基的糖组分（如葡萄糖、蔗糖、棉籽糖和半乳糖）不与其他成分一起进行高压消毒时，实验结果就会好。如果糖组分和其他一起进行高压消毒，就会发生焦糖化。高压灭菌和过滤灭菌交替进行的标准方法是：过滤糖的浓缩储存液，然后将它加入到已高压灭菌的其他组分中。例如，葡萄糖过滤40%（w/v）储存液，按50ml/L的比例加入到高压灭菌的混合成分的培养基中。其他糖类一般地配成20%（w/v）储存液，添加比例为100ml/L。

* psi=pounds per square inch，磅/英寸^2。

复合培养基

酵母抽提物/胨/葡萄糖（YPD 或 YEPD）培养基

该培养基普遍用于酵母常规培养，此时不需要进行营养缺陷型的选择。

10g Bacto 酵母抽提物（1% w/v 终浓度）
20g Bacto 胨（2% w/v 终浓度）
20g 琼脂（2% w/v 终浓度）
950ml H_2O
高压蒸汽灭菌

加 50ml 40%（w/v）葡萄糖（2%终浓度；单独进行高压或过滤灭菌）。

若要制备 YPAD，则在高压蒸汽灭菌前将 20mg/L 的腺嘌呤硫酸盐加入到 YPD 中。

酵母抽提物/胨/甘油（YPG）培养基

该类复合培养基中，非发酵甘油是唯一的限定性碳源。由于不存在发酵碳源，YPG 培养基不能支持小酵母株生长（线粒体功能缺陷突变株）。

10g Bacto 酵母抽提物（1% w/v 终浓度）
20g Bacto 胨（2% w/v 终浓度）
50ml 甘油（5% v/v 终浓度）
20g 琼脂（2% w/v 终浓度）
950ml H_2O
高压蒸汽灭菌

其他发酵碳源也能采用，包括乙醇、乙酸、乳酸或上述的化合物。

酵母抽提物/胨/葡萄糖/甘油（YPDG）培养基

该培养基用于鉴定野生型和小菌落酵母细胞。不同的细胞各自形成大、小菌落。

10g Bacto 酵母抽提物（1% w/v 终浓度）
20g Bacto 胨（2% w/v 终浓度）
30ml 甘油（3% v/v 终浓度）
20g 琼脂（2% w/v 终浓度）
970ml H_2O
高压蒸汽灭菌

加 2.5ml 40%（w/v）葡萄糖（0.1%终浓度；单独进行高压或过滤灭菌）。

特殊目的复合培养基

半乳糖指示剂培养基

用于酵母研究的几个基因表达系统是依赖 GAL（半乳糖）启动子来进行表达调控的。若某一系统不能按预期方向运转，则是由于采用的酵母株不能对半乳糖产生反应。事实上，与半乳糖起反应的酵母株能发酵半乳糖产酸进入到培养基。这种酸化作用引起

指示剂由蓝色变成黄色。

10g Bacto 酵母抽提物（1% w/v 终浓度）
20g Bacto 胨（2% w/v 终浓度）
20g 琼脂（2% w/v 终浓度）
930ml H_2O
高压蒸汽灭菌

加 50ml 40%（w/v）半乳糖（2% 终浓度；单独进行高压或过滤灭菌）。

加 20ml 0.4%（w/v）溴麝香草酚蓝（0.08% 终浓度；单独进行过滤灭菌）。

孢子形成培养基

酵母株以单倍体或多倍体形式存在。当赖以生存的碳源和氮源存在极少时，大多数多倍体菌株就会形成孢子。

10g 乙酸钾（1% w/v 终浓度）
1g Bacto 酵母抽提物（0.1% w/v 终浓度）
0.5g 葡萄糖（0.05% w/v 终浓度）
20g 琼脂（2% w/v 终浓度）
1L H_2O
高压蒸汽灭菌

此配方中，高压灭菌之前加入葡萄糖。

前孢子形成（PSP）培养基

一些酵母株孢子在接种到前孢子形成培养基前，就已经在丰富培养基上生长，从而促使孢子形成。

8g Bacto 酵母抽提物（0.8% w/v 终浓度）
3g Bacto 胨（0.3% w/v 终浓度）
20g 琼脂（2% w/v 终浓度）
750ml H_2O
高压蒸汽灭菌

加 250ml 温热的 40%（w/v）葡萄糖（10%终浓度；单独进行高压或过滤灭菌）。

解剖琼脂

解剖琼脂是专为研究解剖器的构型特制的。一般情况下，使用 YPD 培养基薄板（15mm×100mm 平板铺 10ml 培养基）。光亮（很透明）的培养基效果较好，这是由于加热时间缩短和单独高压灭菌葡萄糖之故。

限定培养基

其最具代表性的是将肌醇加入到合成培养基中。尽管对于肌醇来说，野生型酵母是原养型的，但是一些实验株带有 *ion1* 突变。遗憾的是，有时在报道基因型时该突变往往被忽略，这是因为酵母氮基质（YNB）含有足量肌醇，该突变造成的影响不易被发

现。然而，YNB 中肌醇数量不足以完全补充营养缺陷，那么就会选择补偿突变。

盐和葡萄糖（SD）培养基

这种最低限度培养基含足够的营养成分来维持原养型酵母株（没有营养需要量）的生长。

6.7g Bacto 无氨基酸酵母氮基质（YNB）（0.67% w/v 终浓度）
20g 琼脂（2% w/v 终浓度）
950ml H_2O
高压蒸汽灭菌
加 50ml 40 %（w/v）葡萄糖（2% 终浓度；单独进行高压或过滤灭菌）。

用其他糖类替代葡萄糖制备类似培养基，最常用的替代物是 SGal（2%半乳糖）和 SRaf（2%棉籽糖）。在棉籽糖上的生长有时通过添加 0.05%（w/v）葡萄糖而更加有利。

上述 YNB 配方中包括硫酸铵。酵母在其他氮源上也能生长，尽管较缓慢。相对于这些培养基，不含硫酸铵和氨基酸的 YNB 的使用量为 1.7g/L。氮源包括硫酸铵（0.5% w/v）、精氨酸（0.1% w/v）、天冬酰胺（0.1% w/v）或脯氨酸。

大多数酵母株需要一种或多种 SD 培养基中没有的营养物。

SD 补充培养基

在 SD 培养基中添加一种或多种补充成分（见表 1.6.1），或者也可以在平板上涂布补充成分，使其在一天内渗透到培养基中。高压灭菌前再添加大部分补充成分；高压灭菌之后，加入对热敏感的色氨酸和组氨酸。由于色氨酸长时间地暴露在光下分解，故需避光保存。

合成的复合（SC）培养基

在 SD 培养基中添加由最普通的补充成分构成的混合物，取代了只添加某种单独营养物的培养基。按表 1.6.1 列出的干燥试剂组合，并使用咖啡研磨机或研钵彻底混合研碎。在进行灭菌前，将混合物加入其中；灭菌后，加入色氨酸和组氨酸。

5-氟乳清酸（5-FOA）培养基

URA3 功能的筛选用于多种酵母质粒的稳定保持。然而，某些实验需要 *URA3* 基因的缺失。*URA3* 基因产物将 5-FOA 转化为毒素。因此，*URA3* 基因缺失株通过它们对 5-FOA 的抗性而得以鉴别。

溶液 1：
1g 5-FOA（0.1% w/v 终浓度）
500ml H_2O
6.7g 酵母氮基质（YNB）-氨基酸（0.67% w/v 终浓度）
50mg 尿嘧啶（50μg/ml 终浓度）
20g 葡萄糖（2% w/v 终浓度）

适当的补充成分（见表 1.6.1）。

将 5-FOA、H_2O 和搅拌棒放入 1L 烧瓶中，高压或低温至中热约 1h 搅拌使其完全溶解。加 YNB、尿嘧啶、葡萄糖和补充成分。依照菌株的基因型从表 1.6.1 中选择补充成分，尿嘧啶始终要加。如果补充成分是液体形式，那么就要相应地调整水的体积。完全溶解（通常加热到 55℃）并过滤灭菌。

表 1.6.1　限定培养基的常用补充成分

营养物	储存浓度/(g/100ml)	储存液体积/ml	终浓度/(mg/L)[a]	涂布平板的储存液体积/ml
硫代腺嘌呤[b]	0.2	10	20	0.2
精氨酸・Cl	1	2	20	0.1
天冬氨酸	1	10	100	0.2
谷氨酸	1	10	100	0.2
组氨酸・Cl	1	2	20	0.1
异亮氨酸	1	3	30	0.1
亮氨酸	1	3	30	0.1
赖氨酸・Cl	1	3	30	0.1
甲硫氨酸	1	2	20	0.1
肌醇[c]	3.6	1	36	0.02
苯丙氨酸	1	5	50	0.1
丝氨酸	8	5	400	0.1
苏氨酸	4	5	200	0.1
色氨酸	1	2	20	0.1
酪氨酸	0.2	15	30	0.2
尿嘧啶	0.2	10	20	0.2
缬氨酸	3	5	150	0.1

a. 按照此表纵列数据预先称量每种组分并混合，在咖啡研磨机、碾臼或研钵中混合各种干燥试剂，然后再准确称量此混合物。

b. 研究 *ade1* 或 *ade2* 突变体时，腺嘌呤的含量应增加 3 倍，以防红色堆积。

c. SC 培养基传统配方不含肌醇。由于某些实验菌株带有 *ino1* 突变，但常不被记录，因此，添加肌醇不过是一种预防措施。YNB 含足量的肌醇，虽然不完全，仍可使得鉴定 *ino1* 突变不易进行。

溶液 2：
20g 琼脂（2% w/v 终浓度）
500ml H_2O
在 2L 烧瓶中将琼脂与水混合，高压消毒，然后冷却至≤80℃。
5-FOA 培养基：
溶液 1 与冷却的溶液 2 混合
冷却至 55℃
铺平板。

Xgal 培养基

野生型酿酒酵母缺乏内源性 β-半乳糖苷酶活性，后者更易于 *E. coli lacZ* 编码的β-半

乳糖苷酶作为一个报告活性物质得以应用，平板试验可提供一个活性的半定量分析。

6.7g 酵母氮基质（YNB）-氨基酸（0.67% w/v 终浓度）

适当的补充物质（见表 1.6.1）

20g 琼脂（2% w/v 终浓度）

850ml H_2O

高压蒸汽灭菌

冷却至 65℃

加 100ml 0.7mol/L K_3PO_4，pH7.0（70mmol/L 终浓度；加入琼脂前最好是温热的）。加 50ml 40%（w/v）葡萄糖（2%终浓度；单独高压或过滤灭菌）。将 2ml 20mg/ml 5-溴-4-氯-3-吲哚-β-半乳糖（Xgal）加入到 100% *N*,*N*-二甲基甲酰胺（DMF）中。

酵母培养的综合考虑

就大多数酵母培养而言，方法是非常简单的。尽管野生型酵母能够在一个很大的温度范围内生长，许多菌株低于 4℃和高于 37℃也能一定程度地生长，但普遍选择在 30℃。可应用液体或固体培养基。由于有通气作用，液态培养效果更好，但通气不是必需的。重要的是要获得一致结果，在每次实验时，记录摇床速度，以保持通气再生水平。

在液体培养基中培养酵母

在液体培养基中进行酵母培养简单易行。大部分实验中使用搅拌器更有利于酵母的生长，这是由于它可阻止酵母聚集在液体底层。当使用烧瓶培养时，液体的体积应限制在烧瓶容量的 20%，尽管常常超出了标记线。另一种常规方法是在 18mm×150mm 玻璃试管中培养 1～5ml 酵母的悬管（如 New Brunswick）转动法。这些试管配有金属或塑料帽子。许多品牌的台式或制备离心机可以直接配用这些试管。

酵母细胞可以通过多种方法从液体或固体培养基上转移到新的液体培养基进行培养。一种普通的做法就是使用灭菌的、一次性的、15cm 长的拭药签。它可装入戴帽试管一起高压消毒。其他常用方法就是使用无味、无色的木制牙签，它们可以在原包装盒中进行高压灭菌。

对于其他一系列指定的条件，即酵母株、培养基、温度、搅拌——增代时间和饱和密度，均能容易地确定。大多数菌株在 30℃、有搅拌的 YPD 培养中，每 80～100min 增殖一倍。以大约 3×10^4～1×10^5 个细胞或约 1mm 菌落接种的过夜培养物的细胞浓度将达到大约 3×10^7 个/ml，两天后达到 5×10^8 个/ml。在 SD 或 SC 培养基中生长时，增代时间大约为 120～150min，过夜培养物的细胞一般约达 5×10^6 个/ml。

每毫升培养物细胞数目可以用分光光度计进行估算。用一个标准路径长度为 1cm 的比色杯，波长 600nm，光密度（OD_{600}）为 1.0 时，相当于细胞浓度为 2×10^6 个/ml。由于此方法的依据是测量光散射，不是培养物真正的吸收量，因此这一拇指法则（译者注：拇指法则意指较粗浅的、大概齐的规律。）应该被特殊的分光光度计证实。依据仪器的构型，转换因子可以有很大的差异，分光光度计可以通过比较 OD_{600}时的数值与使

用血细胞计数板得到的细胞准确值来校验，还可通过计数样品稀释后形成的集落数检验。一旦仪器经过了检验，数值就不会每天改变。

固体培养基上的酵母培养

酵母株很容易在固体培养基上进行培养。大多数实验最好使用 30℃培养箱。当在固体培养基上生长率难以估算时，由单个细胞形成的集落一般在 2～3 天后肉眼可见，1 天后可以见到小斑点。这里有 5 种普通方法可将酵母细胞转移到固体培养基上。

平板涂布细胞

在这一方法中，先要计算小体积（通常为 0.05～0.25ml）培养液中悬浮的酵母细胞的数目。该数目依赖于实验性质而定，一般情况是每块平板可产生 20～200 个集落。

按以下方法将一根玻璃棒制成涂布器：截取一段直径 3mm，长约 30cm 的玻璃棒，在火焰上烧灼两端呈平滑状。持玻璃棒于一端约 5cm 处在本生喷灯上烧灼，当玻璃易弯曲时，将它弯成约 45°。持玻璃棒于同一端约 10cm 处烧灼，并弯成另一个 45°，此时，这端已形成一个三角形。与三角平面相连的主干可随意弯成 30°，这样制成的涂布器更具人机工程化。涂布器使用前，将其三角部分浸入到 70%～95%乙醇中，然后在火焰上烧灼。放入细胞悬液之前，将涂布器接触琼脂表面或停留在平板盖上冷却。虽然也可使用未加工的灭菌玻璃吸管涂布细胞，但这样操作比较困难。不推荐使用塑料吸管，它会划破琼脂。

尽管不被要求，但如果使用一台接种转盘（从 Fisher Scientific 和其他实验用品供货商处获得），涂布平板的效果会更好。接种转盘由一块固体基座和自由转动的平台组成，平台与平皿大小近似。

将细胞吸到琼脂上后，应立即将其涂布展开。如果使用接种转盘，给它一个轻柔的推力；如果不使用转盘，就用手不停地转动平板。在琼脂上前后推动涂布器扩散细胞。平板涂布酵母细胞技术，尤其是使用转盘，不同于涂布细菌的一个显著方面是：酵母细胞更易被推散到平板边缘。为避免出现此问题，将涂布器的“肘”轻缓地推到平板的边缘转动几下，当平板仍在转动时，将“肘”部沿平板中心与边缘之间区域来回涂布细胞。

细胞划线法

细胞划线法用于酵母单菌落的分离。分离的单菌落之所以合乎要求，是因为按照严格的操作程序，每一个菌落都来源于一个单独细胞，因此菌落中任何一个细胞都有遗传学性质的均一性。

此方法中，平皿被划分为 4 块馅饼状区域，为形成单菌落，在每一个区域内对酵母细胞的某种样品划线。随着实验技术的提高，还可将平皿划分为 6 块或更多区域。此方法最好使用灭菌的牙签进行。用一根牙签挑取极少量的酵母细胞，置于靠近平皿边缘的一点；再取一根干净的牙签，在 4mm×10mm 的区域内，以该区域的长轴为起点，将酵母细胞以近似平行的划线来回涂布，直到平板边缘；用第三根牙签，通过该区域的短轴，向着平皿中心再次来回划线 15mm；取第四根牙签在琼脂上划弧线，与平皿边缘平

行并通过第三根牙签划出的线，弧线越来越短，不断地向平皿中心移动。将平板孵育2～4天，直到长出可见的单菌落。

细胞贴片法

一旦分离出酵母细胞的纯系菌株，就可在一个单独琼脂平板上收集一系列菌株，因此对于无论是短期储存还是平行复制，细胞贴片法都是非常有用的。在标准的100mm平板上可放置30～100个贴片。

将酵母贴片从一个平板转到另一个平板之前，在一小片纸上画1个规则的方格，并将它插入到洁净的塑料纸内。一张纸（4～8in×10in）可画4块方格。将琼脂板盖子朝上地放置在方格纸上，平板就能够适当地占据一条有双边的窄带，或已卷成圆形的区域。两条窄带比一条窄带能更好地容纳平板。无论是灭菌牙签还是接种圈都能用于贴片技术，但是牙签的效果更好。用牙签末端轻触菌落制成的贴片，轻轻转移到受体平板上的直径约2mm的斑点上。

复制平板细胞

复制平板用于检测多菌株或平行分离。该技术需要三种特殊物品：一个复制块、一个固定圈和方块形丝绒。这三种物品均能从Fisher Scientific，Cora Styles和其他供货商处购买。复制块的直径必须按照所用平皿的直径设计，95mm直径的平皿不能用于按100mm直径设计的复制块。使用合适的布料也是复制平板所必需的。

首次使用前和使用后，布块要在标准洗涤器上清洗，也可用标准的干洗剂处理。如果使用的是重组生物体，在对污染的布块进行干洗前要谨慎地将它们浸泡在消毒剂里。干燥过程中，要小心监测布块，这是因为产生了大量棉绒；如果忽略此步骤，就会损坏干燥机。布块干燥后，用一标准毛刷清除这些棉绒，尽管并不总是要求进行此步骤。用高保险的铝箔包裹布块进行高压消毒。根据使用方式，将5～50块绒布叠成一叠，软面朝下，堆放在一大张铝箔的中央，然后折起铝箔，紧密包裹布块，并用胶带捆扎，干热灭菌。

通过涂布平板、划线法或细胞贴片制成一个母板。一般地，使用前母板要孵育1～3天。如果长出的菌落不过于大或生长过度，那么这块母板的效果会很好。每块高质量的母板可进行至少8次复制。

复制块和锁圈可以用70%乙醇消毒，再用纸巾擦干。绒布软面朝下，小心打开包装，夹起一块布角，翻转使软面朝上，放在复制块上。包装要部分地盖住，以防污染。压下锁圈，紧紧扣住绒布。轻稳地把母板推到绒布面上，然后再提起。以同样方式将每块母板推到绒布上。

在顶层琼脂上悬浮细胞

除非酵母细胞壁受到损害，并且需要渗透支持，这大概是最不常被选择的方法。用水或培养基制备灭菌的Bacto琼脂。加入酵母细胞悬液后，琼脂的终浓度应该在0.5%～1.0%范围内。一旦灭菌后，在沸腾的水浴锅里，琼脂储存液能融化许多倍。例如，对于一块100mm平皿，可将3～10ml融化的琼脂转移到一只无菌试管中并冷却至

37℃，加入小体积的酵母细胞悬液，混匀，然后倾倒在琼脂板表面。几分钟后，翻转平皿，30℃孵育 2～4 天。

酵母株的储藏

酵母株的短期储藏

在室温或 4℃时，大多数酵母株存活期延长，但不能完全依靠此方法。在该温度下的储藏可能会导致活力丧失，更糟的是，还可导致在这些条件下生存更好的无特征性突变株的选择。

在甘油中长期储藏

两种方法普遍用于酵母株的长期储藏：－80℃，甘油/水小瓶储藏法；室温或 4℃，琼脂斜面储藏法。甘油小瓶储藏法是首选方法。

酵母株在－80℃，15％（v/v）甘油溶液中可以无限期地储藏。可以使用任意玻璃小瓶，2ml Wheaton 瓶（实验系列）是理想规格。这些小瓶能在标准的冰冻盒（100 个/盒）内存放。

准备该规格的小瓶，每瓶分装 1ml 的 15％甘油溶液，松松地盖上瓶盖，进行高压消毒。待小瓶冷却，拧紧瓶盖。小瓶可在室温下无限期地存放。

保存菌株时，先做标记。用一支牙签或接种圈从一个新鲜平板中挑选一个单菌落，并将之转移到小瓶内。振荡小瓶直至菌落均匀地消散在液体内，然后将小瓶转移到－80℃冰箱。尽管稍老旧的菌落也可以用做实验，但 1～3 天的菌落最好。

给小瓶做标记会比较困难，这是因为某些标签在如此低的温度下会脱落，并且某些墨水一遇到冰冻就会滑脱。有一种可采用的方法就是使用高质量的办公标签，外面用赛璐玢胶带包裹，胶带的两端黏接紧密，可保护字迹。

液体培养物样品也可使用上述方法保存，尽管不推荐此法。如果要保存液体培养物，就要随液体培养物的稀释相应地调节甘油的浓度。

在 YPAD 斜面上长期储藏

准备好 YPAD 培养基，并在一个沸腾的水浴锅内将琼脂溶解到培养基中，3ml 小瓶内分装 1.5ml 上述培养基，松松地拧上盖子，然后高压消毒。之后，将小瓶倾斜，以便使琼脂恰好低于瓶颈。干燥 1～2 天，拧紧瓶盖。

使用一支灭菌牙签或接种圈，从一个新鲜平板上挑取少量样品，将之转移到琼脂斜面。培养物扩散透过琼脂表面，或深入琼脂。拧紧螺旋帽，用石蜡膜密封。斜面于阴凉（23℃）黑暗处保存。在琼脂斜面保存 3 年以上的酵母仍能够恢复活力。

酵母株的运送

酵母株能通过几种不同的方法进行运送。只要保持无菌，运送的培养物可以是干燥的、琼脂上的或是液态的。最简单的方法是使用灭菌的棉拭子。其他方法一般地需要较长的准备时间或在邮寄中易受损害。

用灭菌的棉拭子运送酵母株

一种方便且安全的方法是使用无菌的取喉部培养物用的棉拭子，如 Becton Dickinson 的 Culturette 系统。它包括一支灭菌的棉拭子和盛放盐溶液的防漏容器，能抵御粗暴装卸。使用该系统时，打开包装，从一个新鲜平板上用棉拭子刮取一个菌落，再将棉拭子插入包装内，做标记，用胶带粘牢或密封。复苏菌落时，取出棉拭子，在 YPD 或其他适当培养基平皿的一个小区域内轻轻擦过，再用牙签作单菌落划线，孵育平板。

滤膜运送酵母株

酵母培养物可以在滤纸上干燥、储存或运送。此方法是由 John Bassel 在 YGSC 发明的，最适于菌株的频繁发送。因为一次就可制备较多的滤膜，并且可在 4℃储藏若干年。无菌滤纸方块（Whatman no. 4，1cm×1cm）用一张经得起磨损的铝箔纸（7cm×6cm）包裹后高压消毒。欲转运的菌株在 YEPD 培养基上呈指数生长，取该培养物 5μl 加入到 0. 2ml 炼乳中。该炼乳需无菌制备，不需再消毒。将滤纸块浸入到细胞炼乳悬液，然后取出放回到铝箔包装纸中，折叠包装一次，放入干燥器内，于 4℃保存 2～3 周，或直到滤纸上的液体凝结成硬的干燥团块。再继续干燥，紧紧折叠包装纸，放入塑料盒内，4℃保存。复苏菌株时，在 YPD 平板上或其他适宜培养基上摩擦滤纸，然后再将滤纸放回到原包装盒内。用牙签将单菌落划线，孵育平板。

酵母株的其他运送方法

其他方法包括发送琼脂斜面（如前所述）或平板。小心包装平板，这是由于它在邮寄中易被打碎。

互联网资源

http://www.atcc.org/
http://www.atcc.org/hilights/sc_info.html
http://dgm2ibm.nihs.go.jp/ygsc.htm
http://genome_www.stanford.edu/Saccharomyces/
http://www.tiac.net/users/cstyles/

参考文献：Guthrie and Fink，1991；Rose et al.，1990

撰稿人：Simon R. Green and Charles M. Moehle

（董　敏　译）

第 2 章　细胞的制备与分离

第 1 章描述了细胞培养的技术。当然，培养细胞首先必须要有细胞，所以第 2 章叙述细胞的制备与分离。成纤维细胞可以从人体中获得而不必损害个体（实际上人皮肤成纤维细胞可以从 ATCC 得到）。由遗传性功能紊乱患者获得的成纤维细胞的培养常被用于鉴定遗传异常性。皮肤成纤维细胞还是转基因或基因敲除动物中研究功能异常特征的工具。制备和培养皮肤成纤维细胞的方法学将在单元 2.1 介绍。

单元 2.2 描述从外周血中分离和培养人的淋巴细胞。通过比较简单且不昂贵的方法可以从 1ml 血液中分离出 1 百万到 2 百万个细胞。除了淋巴细胞梯度离心这种基本的方法以外，还提供了一些分离淋巴细胞亚型的方案。单核细胞/巨噬细胞可以利用它们贴附到塑料制品上的趋向性而被分离（或减除）。将单克隆抗体识别特殊表面分子和磁珠联合应用可以正筛选或者负筛选 T 细胞群或 B 细胞群。这些细胞还可以利用 EB 病毒转化而产生永生的 B 细胞系。

在单元 2.3，我们从血液移向血管，分离出内皮细胞。内皮细胞被广泛地用于探索细胞与细胞之间和细胞与细胞基质之间的相互作用。内皮细胞的功能（或机能紊乱）参与到多种多样的病理学过程，如冠状动脉疾病、肿瘤侵袭以及炎症应答。内皮细胞表面蛋白质的表达和可溶性介质的分泌控制着血管的弹性和渗透性，调节血液凝结和血栓形成，引导白细胞进入炎症区域。内皮细胞在血管生成中起着中心作用，新血管的形成对于肿瘤的生长是必需的。因此，内皮细胞正被广泛地研究以寻求可能抗血管生成用于癌症治疗的制剂。从人的脐静脉中制备内皮细胞的基本方案见单元 2.3。

单元 2.4 提供了通过 EB 病毒转化制备永世化 B 细胞系的方法指导。这种方法使我们可以从静止期人的 B 淋巴细胞中建立和维持这种细胞株，那些静止期人的 B 淋巴细胞可以从血液样品，包括那些因为遗传学改变导致患病的个体中获得（如镰状细胞贫血和囊性纤维变性）。

动物组织是异质性的，因为它们是由多种细胞类型的复合物所组成的。分析这些细胞的功能就需要获得感兴趣细胞的纯样品。一种近代的、为解决这个难题而分离出形态学上确认为同质性细胞群体的途径是激光显微切割（LCM）。这一技术将在单元 2.5 中叙述，它通过低能量红外辐射的激光，有选择地从组织切片里将可见的所需要的细胞收集到塑料膜上。

撰稿人：Joe B. Harford

单元 2.1　成纤维细胞培养的建立

基本方案

成纤维细胞能够从一小块皮肤样品扩展成相当大量的细胞，被广泛地应用于细胞生物学、基因组学、生物化学和/或功能异常患者的基础研究，同样还广泛地应用于转基因或基因敲除动物的研究。

警告： 如果用人的血液、细胞或有传染性的样品做实验，必须遵循适当的生物安全措施。

注意： 在整个操作过程和配制所有溶液时，采用 Milli-Q 的水或设备。

注意： 所有涉及细胞培养的溶液和设备必须灭菌，并且根据相应的无菌技术来使用。外科的手术器械可以用 70%乙醇浸泡消毒，但在使用之前要用 PBS 冲洗，这一点很重要，因为乙醇有“固定”组织的作用。除特殊要求外，所有的孵育都在 37℃、5% CO_2 湿润的培养箱内进行，一些培养基（如 DMEM）需要改变 CO_2 的浓度，以保持 pH7.4。

材料（带√项见附录 1）

皮肤样品：如果从大鼠、小鼠、兔子取材，应在切割之前用 70%的乙醇消毒皮肤并且剔毛，也可以从人的皮肤取材。

√磷酸盐缓冲液（PBS）

含0.5%（w/v）分散酶（dispaseⅡ）（Boehringer-Mannheim）的 PBS 溶液（－20℃下储存最长可达 3 个月；非强制性的）

含0.3%（w/v）胰酶（取自牛的胰腺，Sigma）的 PBS 溶液（－20℃下储存最长可达 3 个月；非强制性的）

√完全培养基

√胰酶/EDTA 溶液

含 0.4%（w/v）台盼蓝的 PBS（室温下保存可长达 6 个月）

冻存培养基：10%DMSO/90%FBS 或 10%DMSO/90%完全 DMEM

15ml 和 50ml 聚丙烯离心管

几个 100mm 组织培养皿的盖子

眼科镊子（2 把）

装有 22 号刀片一次性的外科解剖刀

35mm 组织培养皿或 6 孔培养板

22mm 盖玻片（用铝箔纸包几张盖玻片并高压灭菌）

血球计数器

25cm² 组织培养瓶

1.5ml 冻存管

液氮冻存罐

1. 皮肤样品放在盛有 PBS 的 50ml 离心管里，轻轻地晃动或搅动清洗。
2a. 对于较大的皮肤样品（如包皮、外科取下的样品、尸体皮肤）：把样品放在 100mm 的组织培养皿的盖上。表皮面向下，展开样品。用两把眼科镊子将皮下组织从真皮面上刮除。用外科解剖刀把皮肤切成 0.5cm 宽的小条。进入到步骤 3a 或 3b 或 4。
2b. 对于较小的皮肤样品（如打孔活组织样品）：把样品放在 100mm 组织培养皿里，用外科解剖刀和眼科镊子去除皮下组织。进入到步骤 3a 或 3b 或到 4。
3a. 从人的皮肤样品中移去表皮组织（非强制性的）：用 0.5%分散酶/PBS 在 37℃水浴中孵育 45min～4h（依据样品厚度和皮下组织是否去除完全而定）。然后通过轻轻的搅动 10s 或用眼科镊子机械地分离为完整的皮板。进入到步骤 4。
3b. 从小鼠、大鼠和兔子皮肤样品中去除表皮（非强制性的）：用 0.3%胰酶/PBS 在 37℃的水浴中孵育 30～60min 或者 4℃过夜。把样品放在 100mm 组织培养皿的盖上，表皮组织面向上，用两把眼科镊子机械地刮落表皮组织。
4. 在盛有 PBS 的 50ml 离心管中，轻轻地摇动或搅动清洗皮肤样品。
5. 把真皮样品放在 100mm 组织培养皿的盖上，用一把装有 22 号新刀片的解剖刀把样品切成 2～3mm 的小方块（成纤维细胞只能从被切开的锋利的皮肤边缘向外长出）。
6. 把 5～10 块皮肤小片放在 35mm 组织培养皿或 6 孔板的中央，在皮肤样品上轻巧地盖上一个灭菌的 22mm 盖玻片（图 2.1.1）。
7. 加几滴 4℃完全培养基（DMEM 或者 RPMI）到盖玻片下的空间（沿盖玻片边缘加液，这样就能够被吸到盖玻片下面），然后再加 1～2ml 的 4℃完全培养基到皿或孔中，操作要轻以避免弄乱皮肤标本。
8. 把标本放到孵育箱里培养，每隔 3～4 天在倒置相差显微镜下观察成纤维细胞生长情况（图 2.1.2），每隔 3～4 天换一次培养基。小心操作，不要晃动盖玻片。盖玻片一直要保留到培养的细胞汇合在一起。

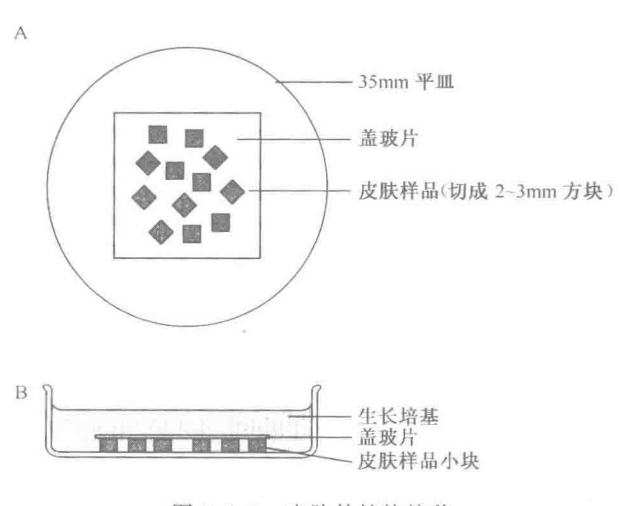


图 2.1.1　皮肤外植块培养

A. 俯视图；B. 侧面观

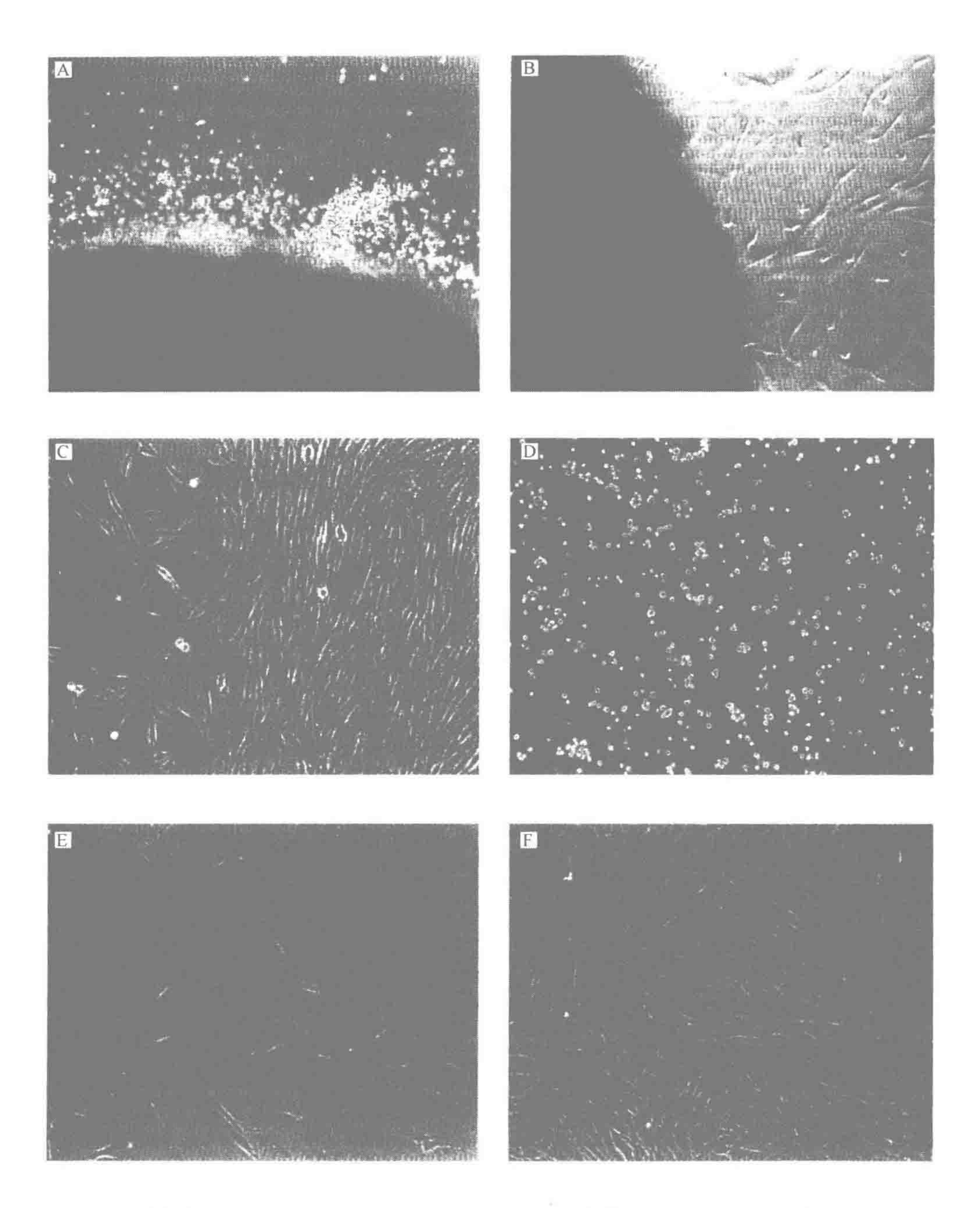


图 2.1.2　应用皮肤小块培养系统从新生包皮样品中建立成纤维细胞培养的显微镜观察（A～C）或细胞分离培养系统（D～F）

（A）培养 1 天的皮肤小块；（B）培养 5 天的皮肤小块；（C）培养 14 天的皮肤小块；（D）分离培养 1 天的皮肤细胞；（E）分离培养 5 天的皮肤细胞；（F）分离培养 14 天的皮肤细胞。注意成纤维细胞从皮肤样品的边缘迁移出来（B），除了原来皮肤样品的位置以外，细胞已汇合（C）。在分离细胞的培养系统里，成纤维细胞贴壁（D），在培养板上扩展（E）并汇合（F）。放大倍数为 40×

9. 根据汇合状况（要在细胞过度汇合和形成像束一样的排列之前）移开盖玻片，用4℃ PBS洗平皿或培养板两遍以去除FBS，因为FBS会干扰步骤10中蛋白酶的作用。如果成纤维细胞爬到盖玻片表面，而不是组织培养的平面上（可通过显微镜调焦判定），把盖玻片放到一个新的皿里，同样用PBS洗盖玻片，然后收获细胞用胰酶消化，见步骤10。

   对于没有分离表皮的样本，常常被过度生长的角质细胞所污染，通过它们鹅卵石样的外形很容易辨认角质细胞。用0.5%分散酶/PBS孵育10～30min就可选择性地去除角质细胞，因为角质细胞对这种处理比成纤维细胞更敏感些。

10. 加1ml 4℃胰蛋白酶/EDTA溶液，在室温孵育3～5min，期间定期地在倒置相差显微镜下进行观察，一旦成纤维细胞变圆，加入1ml冰冷的完全培养基（DMEM或完全RPMI）抑制胰蛋白酶消化，用吸管轻柔地吹打收获细胞，用镊子移开原皮肤样品。

11. 收集成纤维细胞悬液到15ml的聚丙烯离心管内4℃，150g离心10min。吸出上清液，轻弹沉淀体以分散细胞，再用100～200μl新鲜的4℃完全培养基重悬细胞沉淀。

12. 把10～20μl的细胞悬液与等体积的0.4%台盼蓝/PBS溶液混合，用血球计数板在倒置显微镜下计数细胞总数和活细胞数（应大于90%）。

13. 把含3×10^4～10×10^4个活细胞的5ml的新鲜完全培养基接种在25cm^{2}组织培养瓶中，每3～4天更换培养基，直到细胞汇合，像第9步和第10步描述的那样收获细胞。

   图2.1.3是人的成纤维细胞的典型生长速率。人的成纤维细胞能够传代10次，而在形态学或生长速率方面没有重大的变化，但是建议第2代或第3代后冻存细胞（见步骤14）。

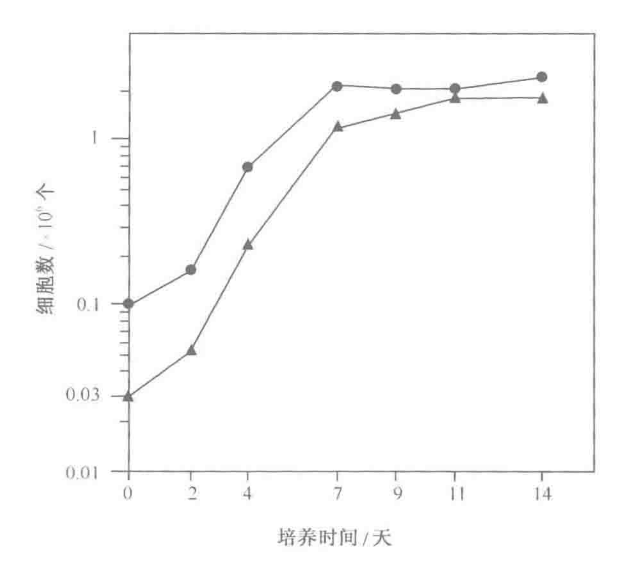


图2.1.3 成纤维细胞生长曲线

第三代人成纤维细胞种植在35mm的培养皿中，用完全培养基RPMI培养，三角形代表每个皿种植3万个细胞，圆点代表每个皿种植10万个细胞。在指出的时间点，用0.3%胰蛋白酶/25mmol/L EDTA孵育后收获细胞并计数。注意，细胞生长相当快，24h增长大概1倍，当细胞汇合时停止分裂

14. 用冰冷的 10%DMSO/90%FBS 或 10%DSMO/90%完全 DMEM 培养基重悬细胞，使细胞浓度为 0.3×10^6～1×10^6 个/ml。在每个 1.5ml 的冻存管里加入 1ml 的细胞悬液，把冻存管放在泡沫聚苯乙烯盒子里使温度逐渐减低，先在－20℃冷冻，然后移入－80℃，最后把冻存管从盒子中拿出放到液氮罐里。

参考文献：Nolta and Kohn，1997；Pandya et al.，1995；Schuhmachers et al.，1995；Suhonen et al.，1996；Xu et al.，1995

撰稿人：Akira Takashima

单元 2.2　人淋巴细胞的制备和培养

警告：如果用人的血液、细胞或有传染性的样品做实验，必须遵循适当的生物安全措施。

注意：与活细胞接触的所有溶液和设备必须是灭菌的，并且根据相应的无菌技术来使用。除非有其他的特殊要求，所有的孵育在湿润的 37℃，5% CO_2 的培养箱内完成。某些培养基（如 DMEM）可能需要调节 CO_2 的水平以使 pH 维持在 7.4。

基本方案 1　通过高分子质量的蔗糖-泛影钠（Ficoll-Hypaque）梯度离心制备淋巴细胞

材料（带√项见附录 1）

抗凝的全血或从供体血液里分离出的白细胞
√磷酸盐缓冲液（PBS），无 Ca 和 Mg（Bio-Whittaker），室温
√Ficoll-Hypaque 溶液，室温
√淋巴细胞培养基（LCM），室温
含 20%肝素化人血浆的 IMDM 培养基（Life technologies）
√冻存液
50ml 圆底离心管
带有 H-1000 转子的 Sorval RT-6000B 离心机（或等效的设备）
1.5ml 冻存管（如 Nunc）
可控制降温速率的冻存盒（如 Forma Scientific 的 CryoMed）
液氮冻存罐

从全血中制备淋巴细胞

1a. 吸 15ml 全血到 50ml 圆锥形底的离心管里，再加入 25ml 室温的 PBS。
2a. 用 10ml 的吸管吸 10ml 的 Ficoll-Hupaque 的溶液加到全血的下面。进入步骤 3。

从供体来源的白细胞制备淋巴细胞

1b. 从供体白细胞悬液中吸 10ml 放到一个 50ml 圆锥形底离心管中，加 30ml 室温

的 PBS。

2b. 用 10ml 吸管吸 7.5ml 室温 Ficoll-Hypaque 溶液放在白细胞悬液下面，进入步骤 3。

3. 20℃，800*g* 离心 20min，用急停。

4. 吸掉大部分界面带以上含有大量血浆和血小板的上清（粒细胞和红细胞是红色的小球，见图 2.2.1）。把全部的界面带（含有淋巴细胞）和一共不超过 5ml 的小球上方的液体一起吸入到 10ml 的吸管里，然后转到一个新的 50ml 圆锥形底的离心管，Ficoll-Hypaque 的第 2 到第 3 梯度带合并在其中。加入 PBS 至 50ml 的刻度线。

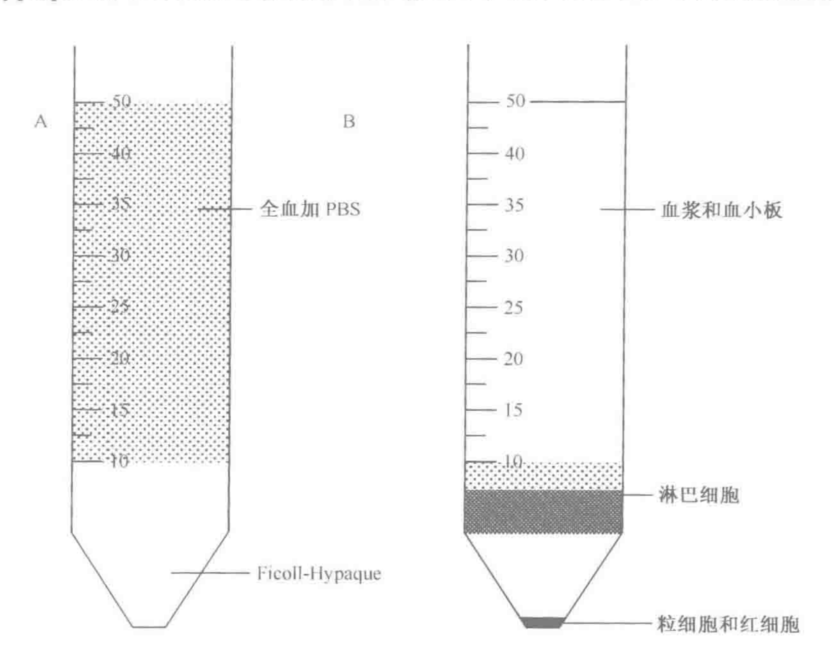


图 2.2.1　用 Ficoll-Hypaque 液梯度分离人淋巴细胞

A 离心前；B 离心后

5. 20℃，600*g* 离心 10min，用刹车。吸出上清悬液，每管再用 10ml 室温 PBS 重悬沉淀。将得到的全部重悬液合并到尽量少的几个 50ml 的离心管里，每管加入 PBS 至 50ml 刻度线。

6. 20℃，300*g* 离心 15min，用刹车。如有必要，可重复操作去除血小板的污染。

7. 吸出含有血小板的上清液，并用室温淋巴细胞培养基 LCM 重新悬浮淋巴细胞沉淀。计数并用台盼蓝排除法测定活细胞的数目。

8. 用抗 CD45（抗白细胞共用抗原）抗体，通过流式细胞仪测定淋巴细胞的制备纯度（参考 Robinson et al. 1998）。

9. 冻存细胞，用 MDM/20％人血清，在冷冻管中按期望的浓度，分两次重悬淋巴细胞。经过 1～2min 逐渐加入等体积的冻存液，每次加液后混匀。然后向每个 1.5ml 的冻存管里加入 1ml 细胞悬液，把冻存管放在可控速率的冻存器里，以－1℃/min 速度冻存，直至－50℃～－60℃，最后把冻存管放到液氮罐的气体相里。

基本方案 2 从淋巴细胞群里制备单核/巨噬细胞和树突状细胞

材料（带√项见附录 1）

√淋巴细胞培养基（LCM），37℃
淋巴细胞群（见基本方案 1）
重组人白细胞介素 3（rhIL-3）、白介素 4（rhIL-4）和 GM-CSF（Pepro Tech）
溶解于 PBS 的 5mmol/L EDTA 四钠（Versene 也可用；Life technologies），用 0.22μl 尼龙滤膜过滤除菌，预热到 37℃
175cm² 组织培养瓶
50ml 圆底离心管
带有 H-1000 转子的 Servall RT-6000B 离心机（或等效设备）

1. 加 20ml 的 37℃ LCM 到 175cm² 的组织培养瓶里，孵育 30min。
2. 将含有 500×10^6 个淋巴细胞的 10ml LCM 加到每个培养瓶里，再加上终浓度为 200U/ml 的 rhIL-3，孵育 3h。每隔 1h 轻轻摇晃培养瓶。
3. 通过吸出培养基去除非贴壁细胞。用 20ml 的 37℃ LCM 培养基洗培养瓶两遍。

分离单核细胞/巨噬细胞

4a. 把 20ml 5mmol/L 的 EDTA/PBS 加入到培养瓶中并且孵育 20min，以松解贴壁的单核细胞/巨噬细胞。
5a. 用力激烈地反复吹打以分散贴壁细胞，然后放到 50ml 的离心管里，进入步骤 6。

产生并分离树突状细胞

4b. 把 30ml 含有 200U/ml IL-4 和 200U/ml GM-CSF 的 LCM 加入到每个培养瓶并孵育 60h。
5b. 将未贴壁的细胞移到 50ml 的离心管里，然后向每个培养瓶加入 20ml 的 5mmol/L 的 EDTA/PBS 并且孵育 20min 以松解贴壁细胞。用力地上下吹打使贴壁细胞分离，再与移到 50ml 离心管中的非贴壁细胞合在一起。进入步骤 6。
6. 室温下，600*g*，离心 10min，吸出上清并且用 LCM 重悬沉淀。
7. 用台盼蓝排除法计数并测定活细胞数（单元 1.1）。通过流式细胞仪检测单核/巨噬细胞群和树枝状细胞群的纯度（参考 Robinson et al. 1998）。

单核/巨噬细胞群通过细胞表面 CD3 和 CD19 的缺失和 CD14 和 CD35 的存在可以与 T 细胞和 B 细胞相区别。树枝状细胞群通过细胞表面 CD1 分子的存在与单核/巨噬细胞群相区别。

基本方案 3 通过包被在磁珠表面的单克隆抗体分选 T 细胞和 B 细胞

材料

淋巴细胞群（见基本方案 1）

用于流式细胞仪分选的抗 CD3 和抗 CD19 抗体（Becton-Dickinson or Coulter）
包被在磁珠表面的抗 CD3 和抗 CD19 抗体（Dynabeads M-450；Dynal）
不含钙和镁的 PBS（Bio-Whittaker）
PBS/HSA：不含钙和镁的 PBS（Bio-Whittaker）中含有 0.5%（w/v）人血清白蛋白（American Red Cross Blood Services）
IMDM/HSA：IMDM 培养基（Life technologies）含有 0.5%（w/v）的人血清白蛋白
抗小鼠 Fab 多克隆抗体（Detachabead；Dynal）
15ml 圆底离心管
磁珠分离装置（Dynal MPC-I 或 Advanced Magenetics Biomag Separator）
水平摇床（如 Clay Adams Nutator ，Becton Dickinson Primary Care Diagnostics）
带有 H-1000 转子的 Sorvall RT-6000B 离心机（或等效的设备）

1. 利用抗 CD3 和抗 CD19 抗体，通过流式细胞仪（或间接免疫荧光染色）检测初始的淋巴细胞群中 T 细胞和 B 细胞大约的数目，然后检测包被了抗体的磁珠上的 T 细胞和 B 细胞数量，这个测定对于纯化所需量的 T 细胞和 B 细胞是必要的（对于每一种特定的靶细胞约需 5～10 个磁珠）。
2. 根据说明书所提供的磁珠的浓度，从原瓶里移出所需量的抗 CD3 和抗 CD19 抗体包被的磁珠，放入一个 15ml 的圆底离心管，加入 PBS 到 14ml 的刻度线并重悬磁珠。
3. 把离心管放在磁场分离装置上 2min（垂直磁场），然后轻柔地吸出悬浮液，使磁珠贴到离心管的一侧。从磁场中移开离心管，加入 10ml 的 PBS，重悬磁珠，再把管子放入垂直的磁场中 2min，像刚才一样吸走 PBS。
4. 加入 2ml 的 PBS/HSA，重悬每个管里的磁珠，把管子放到冰上 15min。
5. 于 10ml 的 PBS/HSA 中，重悬淋巴细胞群（$\leqslant 200\times10^6$ 个细胞）放在冰上 15min。
6. 加 5ml 淋巴细胞悬液到带有抗 CD3 的磁珠的管里，再加 5ml 淋巴细胞悬液到带有抗 CD19 的磁珠的管里。4℃下，将管子轻度倾斜并于水平摇床上摇动，孵育 45min。
7. 把管子放在垂直的磁场里 2min。吸出未被吸附的细胞，注意不要搅乱贴在管子一侧的磁珠。加入 5ml 的 IMDM/HSA 到每个管子里，轻轻地重悬磁珠，再把管子放在垂直的磁场里 2min，像刚才那样吸出未被吸附的细胞。
8. 加 3ml 的 IMDM/HSA 到每个管子里轻轻地重悬磁珠，然后把带有圆锥形底的离心管放在水平磁场里，室温孵育 2min。
9. 小心地去掉 2.5ml 的悬浮液，轻轻地拍打管子以重悬磁珠。加 200μl 磁珠分离液，在室温孵育 30min，每隔 5min 轻轻地重悬一次。
10. 加入 3ml 的 PBS/HAS 到每个管里并重悬磁珠，把管子放在垂直的磁场里 2min，然后吸出并保存含有分选细胞的悬液。小心不要搅乱贴在管子一侧的磁珠。重复此步骤 4 次。保存并合并经每次分离所得的含有分选细胞的上清液。
11. 室温，600*g*，离心分选出的细胞 10min。吸出悬液并用 IMDM/HAS 重悬细胞。计数并用台盼蓝排除法测定的活细胞的数目（单元 1.1）。利用抗 CD3 和抗 CD19 抗

体，通过流式细胞仪检测 T 细胞和 B 细胞的纯度（参考 Robinson et al.，1998）。

参考文献：Boyum，1968；Funderud，1987

撰稿人：William E. Biddison

单元 2.3 人脐静脉内皮细胞的制备

基本方案

警告： 如果用人的血液、细胞或有传染性的样品做实验，必须遵循适当的生物安全措施。

注意： 所有涉及细胞培养的溶液和设备必须灭菌，并且根据相应的无菌技术来使用。除非有其他的特殊要求，所有的孵育在湿润的 37℃，5% CO_2 的培养箱内完成。某些培养基（如 DMEM）需要调节 CO_2 的水平以使 pH 维持在 7.4。CO_2 浓度或温度的变化可能会影响人脐静脉内皮细胞。

材料（带√项见附录 1）

新鲜（<24h）的人脐带 10～15cm
√4℃和 37℃的 RPMI1640 培养基
√磷酸盐缓冲液（PBS；Life technologies）
溶解在 PBS（已过滤除菌）中的 5mg/ml 胶原酶 CLSII（Worthington），37℃
√HUVEC（人脐静脉内皮细胞）培养基，37℃
250ml 广口组织培养瓶
灭菌的纱布垫和纱布
灭菌的剪刀、刀片、止血钳和无齿镊
加样器和黄色的 200μl 加样器吸头
50ml 圆锥形底的离心管
台式离心机
Nunc T-75 组织培养瓶或 75cm² 涂有凝胶的培养瓶（参见涂布凝胶的方法）
150mm 直径的 NUNC 组织培养皿

1. 把脐带放在含有 RPMI1640 培养基的 250ml 的广口培养瓶里，4℃储存，不要超过分娩后 24h。
2. 在灭菌的超净台里操作，台面上铺好灭菌纱布垫，穿上实验服，带上手套，用 PBS 洗脐带。用灭菌纱布拿起脐带，再用刀片切掉脐带两端以获得 10～15cm 长的片段。
3. 用无齿镊子小心地张大脐静脉，避免撕裂，取带有 200μl 吸头的注射器，用 5～10ml 37℃RPMI1640 的培养液冲洗脐静脉。
4. 用新的带有 200μl 吸头的注射器，将 5～10ml 的 5mg/ml 胶原酶冲洗脐静脉。用止血钳夹住脐带的一端并把 10ml 的胶原酶溶液充填到脐静脉里，用第二把止血钳夹住脐带的另一端，颠倒几次让胶原酶溶液铺开。

5. 把被夹住的静脉放在含有温 RPMI1640 培养基的 250ml 广口培养瓶中，室温下孵育 15min。
6. 在 50ml 的圆锥形底的离心管上打开脐带的一端以接收从静脉中流出的液体，用 15ml 的 37℃ HUVEC 培养基冲洗静脉并收集流出的液体。
7. 加入足够的 HUVEC 培养基填满离心管，在台式离心机上，室温，170g，离心 5min。
8. 轻轻倒出并丢弃上清液，轻拍管子重悬细胞沉淀，然后加入 15ml 的 37℃ HUVEC 培养基并接种到两个 T-75 或 75cm^2 的涂有凝胶培养瓶里，孵育 1.5h。
9. 1.5h 后，去掉原培养基，再加入 15ml 新鲜的培养基，孵育 2～3 天（直到细胞汇合）。当细胞形成汇合时，平分每个培养瓶里的细胞到 4 个 150mm 的组织培养皿里。

这些细胞被认为是第 1 代。超过了 6 代的细胞不能被使用。第 2 代的一些细胞可以放在液氮罐里冻存以备将来使用（单元 1.1）。图 2.3.1 显示培养的内皮细胞。

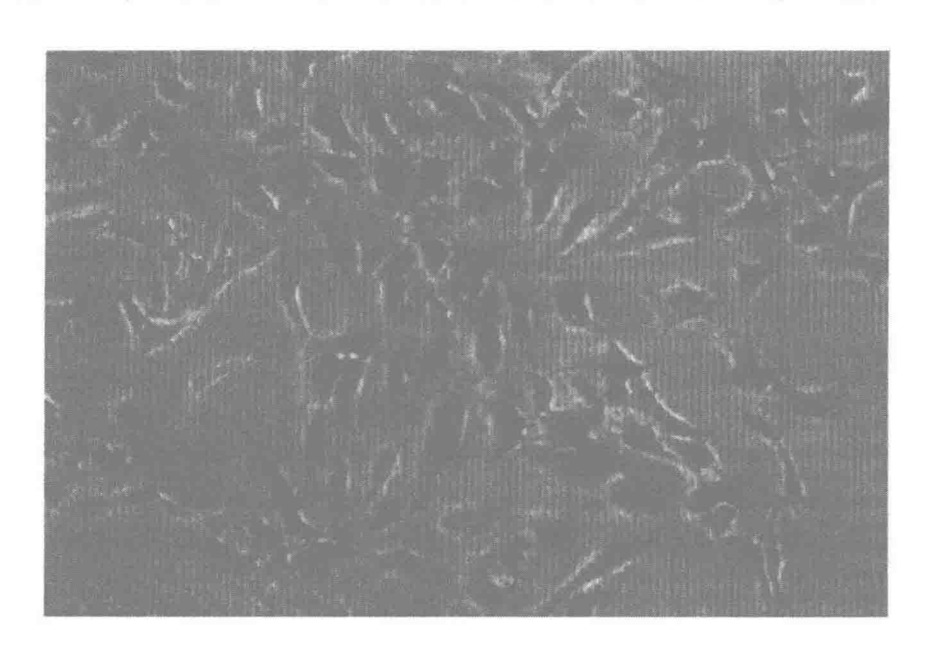


图 2.3.1 传代后 2 天人脐静脉内皮细胞的培养。第 3 代细胞，大概 70％已经汇合，分别用 Diff-Quik 固定液和 Solution II（Baxter）染色。用 Zeiss 倒置显微镜观察

单元 2.4 转染 EB 病毒产生永生的 B 细胞株

基本方案

小心：EB 病毒是大家熟知的病原体，必须遵循适当的生物安全措施。

注意：所有接触细胞的溶液和设备必须灭菌，并根据相应的无菌技术来操作。所有的细胞培养需在湿润的 37℃，5％ CO_2 的培养箱内完成。除非另有其他的特殊要求，

某些培养基（如 DMEM）需要改变 CO_2 的水平以使 pH 维持在 7.4。

材料（带√项见附录 1）

√完全培养基 37℃
B95-8EBV-转化的绒细胞株（ATCC＃CRL1612）
由 OKT3 杂交瘤产生的抗 CD3 单克隆抗体（ATCC＃CRL8001）
$25cm^2$ 和 $75cm^2$ 组织培养瓶
带有 H-1000 转子的 Sorval RT-6000B 离心机（或等效的低温离心机和转子）以及 50ml 的离心管
0.45μm 灭菌滤膜

1. 在完全培养基中，按 1×10^6 个/ml 重悬 B95-8 细胞，接种在 $75cm^2$ 组织培养瓶里，每个瓶里加 50ml 的培养液孵育 3 天（直到≥95％细胞成活并达指数生长期；见单元 1.1，关于基本的细胞培养技术和活细胞的检测）。
2. 转移培养细胞到 50ml 的离心管中，4℃，600*g*，离心 10min。过滤上清液（其中应该达到每毫升含有 $10^2\sim10^3$ 的致病单位）通过 0.45μm 灭菌滤膜，按 0.6ml 的倍数分装，－70℃储存。
3. 如同在单元 2.3 描述的那样制备外周血淋巴细胞，在 37℃完全培养基中，以 1×10^6 个/ml 的浓度重悬淋巴细胞，把 5ml 的淋巴细胞悬液加到立式的 $25cm^2$ 组织培养瓶里。
4. 加入终浓度 10μg/ml 的抗 CD3 抗体，在立式培养瓶里孵育细胞和抗体 1h。
5. 把 0.5ml 含 EB 病毒的 B95-8 的上清液（由第 2 步获得）加入到培养瓶，在立式培养瓶中孵育 1～2 周（直到培养基开始变成橘红色/黄色并可见到小的细胞团）。
6. 加入 5ml 的新鲜 37℃完全培养基，孵育 2～3 天后，去掉 5ml 的悬液，再加入 5 ml 的新鲜 37℃完全培养基并继续孵育，像此步描述的那样重复培养直到细胞总数超过5×10^6 个。
7. 把生长的细胞转移到含 50ml 37℃完全培养基的 $75cm^2$ 培养瓶中，培养至细胞浓度 ≥1×10^6 个/ml。
8. 冻存等分的细胞（单元 1.1），并保留 B 细胞系。按 1×10^5 个/ml 完全培养基平分细胞，孵育到 1×10^6 个/ml，然后再平分。

单元 2.5　激光捕获显微切割

激光捕获显微切割（LCM）是在显微镜直视下，为从组织切片中获得纯细胞群体提供的一种快速和可靠的方法。该系统由倒置光学显微镜（有或没有荧光模块）和红外激光发射器两部分结合而成以利于观察并获得细胞（图 2.5.1）。

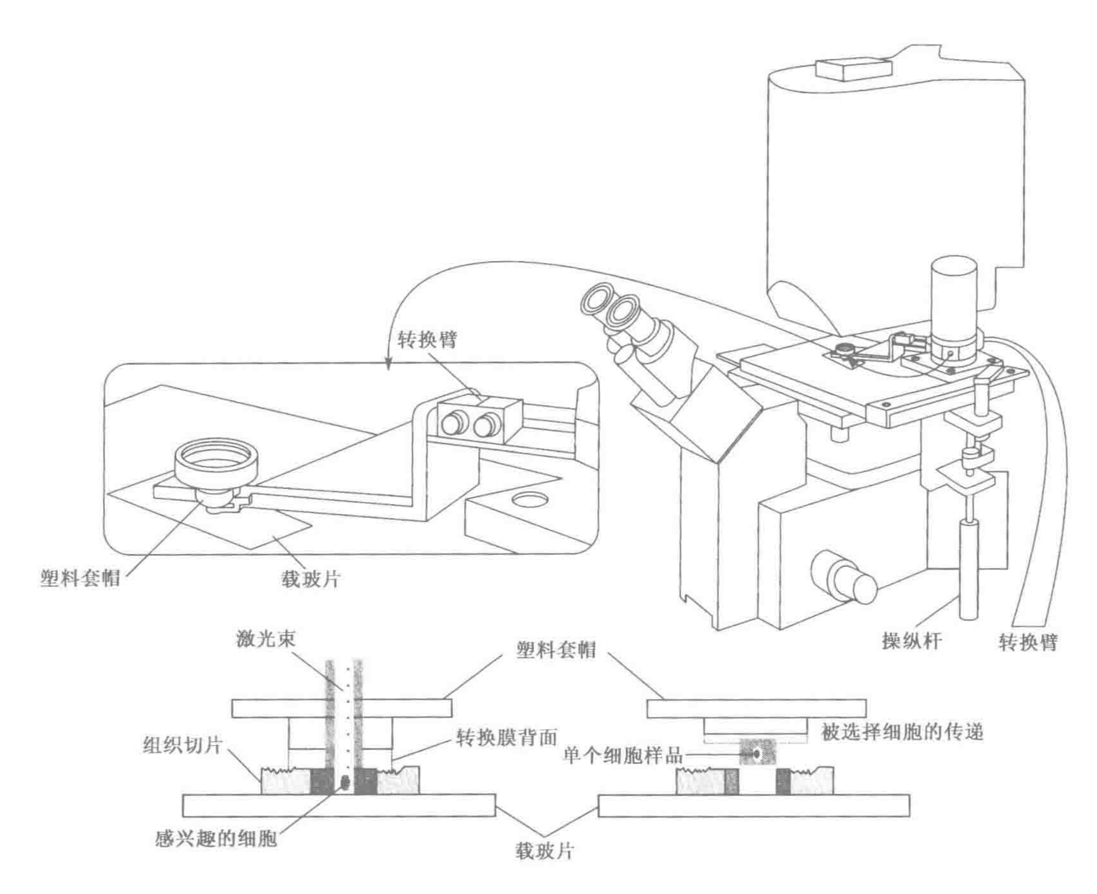


图 2.5.1 激光捕获显微切割显微镜的示意图

通过激光束的激活并在显微镜的直视下，单个细胞可以被分离，用于各种类型的分子生物学分析

基本方案 从组织切片中分离一种纯的细胞群

材料

染色的组织样品，冰冻的或福尔马林固定-石蜡包埋的，切成 2～10μm 切片，并裱贴在平的未用过的显微镜载玻片上

PixCell II 型激光捕获显微切割系统（Arcturus Engineering）

CapSure 转膜（Arcturus Engineering）

压缩气体去尘器

CapSure 垫（Arcturus Engineering）

移开套帽工具（Arcturus Engineering）

1. 安装带有 CapSure 胶片的 CapSure 盒。
2. 移动操纵杆至垂直位，使套帽到达捕获区的适当位置上。把含有制备好并染色的组织样品的载玻片放在显微镜的载物台上。当显微切割的目标出现在视野范围内时，打开真空泵，在控制器前面使载玻片固定住。

3. 向后或向前滑动 CapSure 盒使套帽放到 CapSure 盒上。滑动 CapSure 帽上方的转换臂，然后提升转膜的转换臂并且使套帽放在载玻片上。
4. 为了实现 PixCell II 激光，打开位于操纵台前的开关，并且按一下激光实现按钮。
5. 为了确保靶激光光束由选中的 7.5μm 孔径的点内聚焦，使用位于在显微镜左侧的点大小调节钮调节。转动显微镜到 10× 的目镜，减少光密度，直到在监测器上观察到的几乎是黑色的，并且很容易看到目标光束。用位于点大小调节钮下面的微调，调整靶光束直到光束变成一个轮廓最鲜明的、最汇聚的光，没有或者只带一点光环效应。
6. 选择适当的激光孔径大小以进行显微切割。通过调整位于操纵台前面的电源和激光脉冲的持续时间，以改变“捕获”区的直径，把靶设定作为参考点。校正那些设定向上或向下，以确定待切割组织的类型厚度所要用的激光。表 2.5.1 中是我们建议的设定参数。

表 2.5.1　激光显微切割的设定参数

孔径/μm	电源/mW	持续时间/ms
7.5	25	3.0
15	30	5.0
30	30	8.0

7. 用压缩空气去尘器去掉残留的二甲苯使已染色的切片干燥。显微切割感兴趣的细胞，用靶激光束引导显微切割，按压旋钮开关进行单次的显微切割。若要多次显微切割，持续按下旋钮开关。若调整切割的频率间隔，在操纵台上选择“重复”键，然后就

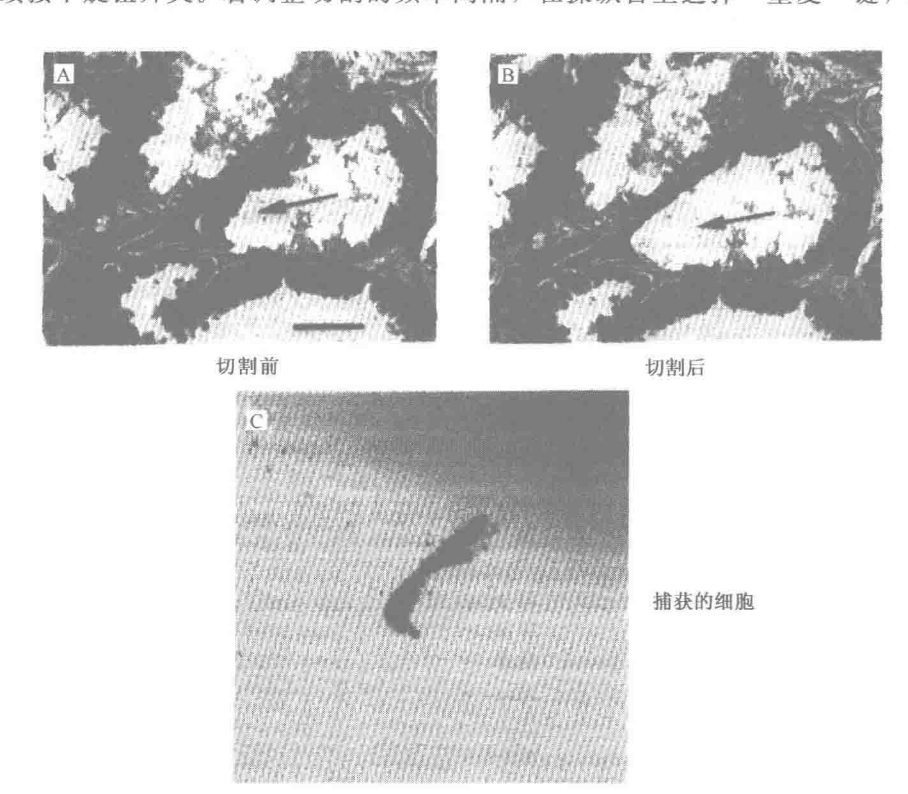


图 2.5.2　复杂组织结构的激光捕获显微切割

当套帽中不存在非特异的细胞，显微切割后也不留有残存细胞时，成功的细胞转移就实现了

A. 异源的前列腺组织；B. 正常腺上皮细胞移开了；C. 5min 之内转移到了 EVA 膜上

可以选择两次激光脉冲间的时间间隔。

8. 当激光发射时，用一个黑圈保持周围一个十分洁净的外环，观察潮湿的区域。如果不能观察到潮湿区域的话，重新聚焦靶光束。
9. 在收集到所需要的细胞数后，用转换臂把套帽从玻片上举起来。抬起并旋转转换臂，直到套帽到达套帽移开的位置。降下转换臂，然后旋臂回到载玻片上，而将套帽留在将它移开的位置上。用所提供的工具移开套帽。
10. 用 CapSure 垫吸干 CapSure 转膜上的聚合体表面，以去除非特异的黏附在膜表面上的碎片。为了成功地进行显微切割，要检查载玻片和套帽（图 2.5.2）。把套帽的聚合体端插入到 500μl 小离心管的上端。提取想要的成分或者冻存在 −80℃ 中以备日后的分析。

支持方案　苏木素和伊红染色组织的激光显微切割

表 2.5.2 是进行碱性苏木素和伊红染色的大致反应程序。尽管 LCM 不限于苏木素和伊红的染色，但它可能是最常用的染色。可以在 Coplin 染色缸或者在架子与平皿上染色。DNA 可以从冻存的组织里获取，也可以从被福尔马林或乙醇固定了的石蜡包埋的组织里获取。RNA 和蛋白质的获取最好用冻存的组织或可选用乙醇固定石蜡包埋的组织。当用福尔马林固定时 RNA 和蛋白质会发生交联。然而福尔马林或乙醇固定石蜡包埋的组织，其形态学总是比冰冻固定的组织好。并且这常常是采用何种组织固定方法的决定因素。

参考文献：Emmert-Buck et al.，1996

撰稿人：Lu Charboneau，Cloud P. Paweletz，and Lance A. Liotta

表 2.5.2　苏木素-伊红染色的冰冻组织和石蜡包埋组织进行 LCM 的反应程序

试剂	冰冻组织切片	石蜡包埋的组织切片
二甲苯	—	2×5 min[b]
100%乙醇	—	30 s
95%乙醇	—	30 s
70%乙醇	5 s	30 s
去离子水	10 s	20 s
Mayer 苏木素	30 s	30 s
去离子水	10 s	20 s
Scott 自来水	10 s	20 s
70%乙醇	10 s	20 s
伊红	60 s	60 s
95%乙醇	2×10 s	2×20 s
100%乙醇	2×10 s	2×20 s
二甲苯	30～60 s	30～60 s

a. Mayer 苏木素和伊红 Y 可购自 Sigma-Aldrich；Scott 自来水可购自 Fisher。

b. 脱蜡必须彻底。

（王艳辉 译　陈克铨 校）

第3章　亚细胞组分分离和细胞器分离

在18世纪早期，列文虎克发现禽类与两栖类的血液细胞中有一“空白区”，它基本上与目前我们所知的细胞核结构相符。这可能是最早认识到真核细胞内不只是有胞浆囊液，还包含亚细胞结构。尽管有核细胞的概念是在18～19世纪建立起来的，但是真正开始分离亚细胞结构是在20世纪40年代中期电子显微镜技术刚刚问世的时候。电子显微镜所揭示的图景远比列文虎克想像的要复杂。与电子显微镜技术进步并行发展的是分离亚细胞组分的方法学的建立。20世纪50年代，同步发展的方法导致真核细胞主要细胞器的发现及分离。最终，当细胞的生物化学功能与特殊亚细胞结构组分相联系起来时，更为清楚的真核细胞的真实图景便展现在众人面前，随之而来的是现代细胞生物学学科的出现。

第3章旨在详述亚细胞组分分离的方法。本章的开头回顾了细胞组分分离技术（单元3.1），内容包括一些基本原理以及离心所需的仪器设备。同时介绍了各种离心所需的基液，范围从蔗糖溶液到最新的基液（Ficoll、Percoll、Metrizamide、Nycodenz及Iodixanol）。

最早期的亚细胞组分分离多以大鼠肝脏为原材料。单元3.2介绍从大鼠肝脏分离质膜片层与结构域所用的方法（单元3.2）。该方法可分离足量的和纯的质膜片层以适用于众多分析及制备目的。例如，这些制备物可作为分离肝细胞膜蛋白的原材料。这些质膜片层也可以作为得到极化的肝细胞膜的细胞顶部及基底部结构域的原料，该过程会在单元3.2中介绍。

以细胞生物学者的先驱——Camillo Golgi命名的细胞器高尔基体，是通过由Golgi改进的固定组织及组织染色的方法鉴定出的。尽管在19世纪以前就有人对Golgi所提到的“内质网器”进行观察，但是直到今天，高尔基体仍然是众多细胞生物学家密切关注的细胞器。单元3.3描述了在制备基础上分离高尔基体。有的方案描述了利用蔗糖密度筛（barrier）及轻线粒体组分浮选，从大鼠肝脏中分离D-葡萄糖处理过的高尔基体。还有方案描述了从培养细胞中分离高尔基体用于分析高尔基体的标记酶-UDP-半乳糖半乳糖基转移酶的方法。

线粒体、过氧化物酶体、溶酶体三者的密度极其相近，其结果是在密度梯度液中，上述细胞器共同沉积出来，并被称为“轻线粒体组分”。分离基液的发展明显地提高了分离这些细胞器的水平。单元3.4～3.7详述了如何分离这些细胞器。

单元3.5～3.6的内容主要是讲解从大鼠的肝脏以及其他来源，包括从培养的哺乳动物细胞及酵母细胞中分离线粒体的方案。单元3.5集中讲解用差速离心法快速分离有代谢活性线粒体的方案，而单元3.6描述包括密度-梯度离心法在内的进一步纯化线粒

体的方案。

单元 3.7 讲解从哺乳动物组织及培养组织的细胞中分离过氧化物酶体的方案。该单元还包括：如何从酵母细胞中分离过氧化物酶体的方案及评估从不同起始材料中分离亚细胞结构的成功率。

单元 3.8 集中介绍了列文虎克提出的“空白区”——细胞核。如前所述，大鼠肝脏常作为亚细胞组分分离的材料。本单元包括分离大鼠肝细胞的两个方案：第一个方案使用了蔗糖密度筛，而第二个方案采用 Nycodenz 作为密度基液。尽管大多数制备细胞核的方案使用软组织（如肝脏），但本单元介绍的方案则可使用其他来源的组织材料（如培养的细胞、植物），只要这些材料能制备成合适的匀浆。单元 3.8 还包含两个方案，它们用于从已分离的核中纯化核膜，而支持方案详述了测定 DNA 及 RNA 的方法。

酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）细胞中包含了所有的膜性细胞器，这些是高等真核生物的特征，这种酵母细胞中只含单倍体基因组，其总量不足 *E. coil* 的 4 倍。酿酒酵母完整基因组序列的实用性、酵母菌的易于培养（单元 1.6）及遗传学上的可操作性，使其成为真核细胞生物学中普遍采用的模型。事实上，研究酵母的细胞生物学有助于深入研究众多酵母及其他哺乳动物的基因组。该种酵母中某些值得关注的细胞器会在本章前几单元中介绍。

单元 3.9 介绍了如何基于离心技术获取酿酒酵母细胞中主要细胞器的方法。上述方法多以制备原生质体为开端，而制备的方法会在本单元起始的支持方案中作介绍。玻璃珠裂解法可破坏完整的酵母细胞（也会详述的），从而产生含亚细胞组分的裂解物。由于多数酵母细胞的细胞器易碎，故多数方案都采用原生质体裂解物，而玻璃珠裂解物主要用于制备细胞溶胶及质膜。大多数的方案都对酵母细胞的胞外蛋白、胞内蛋白及蛋白质生物合成中出现的干扰因素进行分析。本单元包括分离酵母细胞核、囊泡、线粒体、过氧化物酶体、内质网膜及细胞溶胶的备择方案。

撰稿人：Joe B. Harford

单元 3.1　细胞组分分离概述

近半个世纪以来，细胞组分分离技术被细胞生物学家广泛应用。它始终是卓有成效的方法（即使不是最必不可少），研究者由此可以确定真核细胞中多种组分的构成及它们的功能。该方法也为日益增多的无细胞体系实验提供了必需的成分，这些实验是在试管中重建复杂的、包括各组分间相互作用的细胞内事件。对细胞器组成及其功能的许多认识多是通过对哺乳动物组织进行细胞组分分离而获得的，这些组织中的细胞数量众多，并呈现高度分化（因此细胞器也丰富）。但是，随着分子生物学新技术的出现，对完整细胞的重组研究和对功能重组研究的热衷，组分分离已经涉及体外培养的细胞系及遗传学可操纵性低的真核细胞。

通常，实验的性质决定细胞组分分离目的的差异。对于准备性实验，目的是为了大量分离一种特殊细胞器，这些细胞器或用于深入研究，或用于再次分离，因此其重点首先是纯度，其次是产量。对于分析性实验，目的不是为分离细胞器，而是为预测那些与

特定细胞器相联系的特定大分子，这种实验注重的是利用直接的方法确定不同细胞器的位置（与通过标记活性所确定的一样），而不是彻底地分离细胞器。最后，为建立无细胞体系而分离制备细胞器，其目的是为保持这些细胞器的活性。通常，实验人员已经建立了特异性的实验，该方法可在不受细胞器纯度的影响下，检测各组分之间的相互作用，所以，无关细胞器的污染就显得不那么重要了。

细胞器不同的物理特性决定了其在细胞组分分离过程中的分离情况，这些特性包括大小（及形状）、浮力密度及表面电荷密度，它们能反映出细胞器的组成不同。特殊的组分分离技术是针对一种或多种特性的。例如，凝胶过滤分离是以组分大小为基础的，离心技术则基于组分大小与密度，电泳技术以组分表面电荷为基础。随着对特殊细胞器的特定组成认识的不断深入，使用新的技术如亲和层析及选择性密度调档干扰技术已成为可能。不论使用哪种分离方法，为了适应不同的要求，具体的操作过程需要加以修改。即使是从不同来源的组织或细胞中分离同一种特定的细胞器，调整分离条件都可能是十分必要的。换句话说，除了分离出所需的细胞器以外，实验者还要对所分离的组成进行定性分析。

在细胞组分分离过程中，离心是最为广泛应用的技术。它主要将粗提的组织匀浆物（通常量很多）分为亚分离物，这些初级成分将用于许多特定的提纯过程。此外，在实用技术中，使用与转头搭配的不同几何常数和分离基液，可以依不同的大小、密度或二者兼有进行分离，如今离心技术已可常规地对小至亚毫升大至数升的容量进行精细纯化，没有其他的技术有如此多的功能。凝胶过滤受树脂孔径的限制，只有那些直径小于100～200nm的形状规则的空泡，可以从较大的或形状不规则的细胞器中分离出来。利用电泳技术来纯化细胞器较为常用，尤其对于准备性实验。与凝胶过滤一样，它的成功率取决于离心所得的原材料。纯化特定细胞器（如胞内体）看似容易但经证明很难实现，这是由于大部分细胞器表面电荷密度的差别不大之故（或者说仅足以操作），因此使纯化成为具有多个步骤的过程。基于这些原因，本概述接下来的内容主要是注重利用离心手段分离细胞器。针对每一个主标题细节的描述，读者可以浏览由 Rickwood (1984) 主编的优秀读物。

离心的基本原理

理解不同细胞分离手段原理的最好途径就是检验 Svedberg 方程，该方程从数学角度描述了球形颗粒在不同流体中的沉降过程：

$$\frac{\mathrm{d}x/\mathrm{d}t}{\omega^2 x}=\frac{2r^2\ (\rho_p-\rho_m)}{9\eta}$$

式中，x 是颗粒到旋转轴的径向距离；t 代表时间；ω 代表角速度；r 是颗粒的半径；ρ_p 和 ρ_m 分别代表颗粒与介质的密度；η 是介质的黏度。

这一方程描述了沉降速度、$\mathrm{d}x/\mathrm{d}t$、单位离心场强 $\omega^2 x$（该值是由仪器所设定的）是随颗粒直径的平方及颗粒与介质的密度差的增加而增加，随黏度系数的增加而降低的。举例来说，颗粒在 0.25mol/L 蔗糖介质中以不同速度沉降，此时该介质的密度低于颗粒的密度并且黏度系数也低，那么颗粒的半径就是沉降速率的决定因素。与此相反，在使用等密度梯度离心方法时，自离心管口至管底部介质密度均不相同，其范围通

常包括绝大多数颗粒（空泡）的浮力密度。因此，不同类型空泡在离心时开始下沉，直至 $\rho_p=\rho_m$ 时，它们停止运动。另一方面，当 $\rho_p<\rho_m$ 时，颗粒朝向管口移动。很显然，该方程同时描述了沉降或悬浮会在高黏度系数的介质中变缓慢。如下所述，用于离心的不同高密度介质间的区别在于它们不同的黏度（以及渗透性）。

Svedberg 方程也可以用于描述在使用离心方法中遇到的另外三种基本关系。第一，每单位离心场强的颗粒沉降速度（方程左边的变量），它代表沉降系数，其度数是以秒计的，这就是熟知的沉降系数（Svedberg，S），$1S=10^{-13}s$，这与许多生命大分子（如 5S RNA）的沉降系数是同一数量级的。第二，即离心场强 $\omega^2 x$ 被重力加速度所标准化，它代表相对离心力（$RCF=\omega^2 x/g$）。离心条件最宜表达为 $\times g$。RCF 常代表离心管中点的场强大小（g_{av}）。离心场强这一术语代表了每秒单位弧度的角速度，它也可以容易地被转换为每分钟转数，这一单位常出现在表达式中。例如，$RCF=11.18r\ (N/1000)^2$，其中 N 代表 r/min。第三，Svedberg 方程中加入时间变量，它们的表达如下：

$$t=\frac{1}{s\omega^2}\ln\left(\frac{X_{max}}{X_{min}}\right)=\frac{k}{s}$$

其中

$$k=\frac{1}{\omega^2}\ln\left(\frac{X_{max}}{X_{min}}\right)$$

这一方程也可用于测算时间，该时间是具有一定沉降系数的颗粒从离心管顶部运动至底部所需的。常数 k 中包含了转头的几何学关系（X_{max}/X_{min}）及角速度。常数 k 被制成表格，这些数据与大多数转头均匹配。上述物理量常用于估算离心中使颗粒成为沉淀所需的离心时间，它们还用于描述两个转头间的离心条件的转化。对于两个已知的颗粒或空泡，k/t(转头1)$=k/t$(转头2)。

仪器设备

通过离心使细胞组分分离必须利用多种仪器设备。这些设备包括匀浆器、有相配套转头的离心机（一般是一台低速离心机，一台超速离心机）、一台测量离心介质（离心前使用）及梯度组分（离心后使用）折射率的折射率仪、一台能产生密度梯度的梯度形成装置，以及一台在离心后卸载梯度组分的收集装置。折射率仪、梯度形成装置及梯度卸载装置在密度梯度及速率带沉降中都非常有用。

离心机

在绝大多数细胞器纯化过程中，要求样品保持在≤4℃，所以离心机必须能制冷。低速离心机常用于经典纯化程序的前期纯化步骤，可沉降大颗粒如细胞核及未破碎的细胞，通常离心容量较大。超速离心机主要用于随后的高速旋转而且其容量相对较小。这些仪器均有抽真空设备，因此转头在一个抽真空的小室中旋转，以此来减少摩擦力（及由此产生的热量）。

转头

通常情况下，转头有三种类型：固定角度型、垂直型（或近似垂直的）以及水平型

(图 3.1.1)。连续流动及分带转头是不常用的，它们在旋转过程中既可以进样也可以出样。固定角度型的转头侧重点在于速度和容量。这些转头多数能产生超过600 000g的RCF，即常数k值低，一次便能处理数百毫升的液体，因此常用于使分离的组分沉淀成团，尤其是从大容量液体中分离。大部分固定角度型转头使离心管与垂直轴向间保持一定倾斜角度。当开始离心时，管与垂直轴呈放射状，而不是垂直轴与管长轴平行。因此，液面形成斜面并横跨倾斜的离心管，而且其长度较短；颗粒能朝外移动直到碰撞离心管外壁，随即沿管壁“下滑”最终聚集在一起（图 3.1.1）。对于垂直型转头，液面长度是离心管的宽度大小。从图中可以清楚地看到，在固定角度型转头及垂直型转头的离心机中，离心管中的液体在离心加速过程中会改变方向，从平行状态转变成垂直状

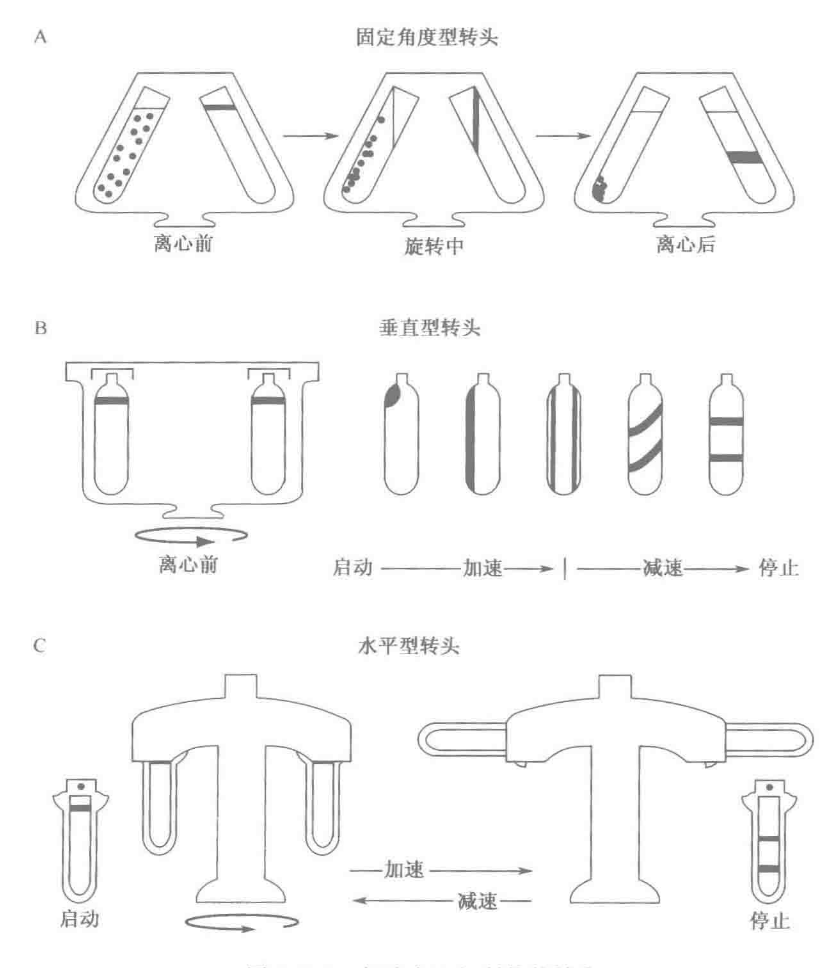


图 3.1.1 超速离心机所使的转头

A. 固定角度型转头。每一图例中左侧的离心管显示从均匀悬液产生沉淀的过程，右侧离心管显示在高密度液体表层条带的沉降过程。沉降过程呈放射状（颗粒朝向外管壁移动，随后沿壁向下沉淀）。注意右管中的条带在旋转中及旋转后是如何重新改变其位置的。B. 垂直型转头。图中显示出旋转前样品条带位于高密度液体的表层。注意在旋转过程中（右侧依次显示的示意图），条带先是沿内侧管壁分布，随后变为垂直状。减速过程中条带呈平行状。C. 水平型转头。注意上图左侧离心管的顶部有样品。摆桶是垂直挂在转头上的。在旋转过程中，摆桶位于水平位置，条带沿管的长轴分开。由于沉降过程呈放射状，条带中的颗粒总是集中于朝向或背离观察者的管壁上，而不是在管的中央。减速过程的末尾，摆桶又恢复到原先垂直的位置

态，而在减速过程中又逐渐变回原样。这些转头有利于密度梯度离心，因为在离心过程中较短的液层很容易达到平衡，而且不同密度条带数目会随减速过程中离心管的方向改变而增加。

对于水平型离心转头，离心管的取向在加速过程中会从垂直变到水平，而在减速的末期再从水平变到垂直。在这一过程中，离心力是沿着离心管的长轴。但是，需注意的是，正是由于离心力是放射状，故沉降的颗粒容易在靠近管壁处聚集形成团状。还有，这些转头适用于液层较长离心力较低的情况，这是因为 k 常数往往比固定角度型转头要高得多。因此，这些转头主要用于密度梯度离心和速率区带离心，而很少用于使分离组分沉降成团。

折射率仪

折射率仪用于测量分离细胞器所用溶液的折射指数。折射指数与密度密切相关，下表（表 3.1.1）描述了蔗糖溶液在较大浓度范围内两种参数的关系。对于其他梯度介质，通过取整数体积的精确配制的不同浓度溶液来称重，也可绘制这样的表格。测量折射指数/密度对于区分离心后在不同梯度中细胞器组分尤其有帮助，而且它能保证在不同试验中不同梯度的可重复性。

表 3.1.1　20℃[a] 下，等量蔗糖溶液的密度及折射指数

百分率/(w/w)	摩尔浓度	密度	折射指数	百分率/(w/w)	摩尔浓度	密度	折射指数
2	0.06	1.006	1.3359	38	1.30	1.166	1.3958
4	0.12	1.014	1.3388	40	1.38	1.176	1.3997
6	0.18	1.022	1.3418	42	1.46	1.187	1.4036
8	0.24	1.030	1.3448	44	1.54	1.197	1.4076
10	0.30	1.038	1.3479	46	1.62	1.208	1.4117
12	0.37	1.046	1.3510	48	1.71	1.219	1.4158
14	0.43	1.055	1.3541	50	1.80	1.230	1.4200
16	0.50	1.064	1.3573	52	1.88	1.241	1.4242
18	0.56	1.072	1.3606	54	1.98	1.252	1.4285
20	0.63	1.081	1.3639	56	2.07	1.263	1.4329
22	0.70	1.090	1.3672	58	2.16	1.275	1.4373
24	0.77	1.099	1.3706	60	2.26	1.286	1.4418
26	0.84	1.108	1.3740	62	2.35	1.298	1.4464
28	0.91	1.118	1.3775	64	2.45	1.310	1.4509
30	0.99	1.127	1.3811	66	2.55	1.322	1.4558
32	1.06	1.137	1.3847	68	2.65	1.335	1.4605
34	1.14	1.146	1.3883	70	2.76	1.347	1.4651
36	1.22	1.156	1.3920				

a. 经 ISCO，Inc 允许，由 Hofmann 修订。

梯度形成装置

该装置由两个小室组成，沿着小室的底部两者间有相连的通道，其中一个小室有出

口，先与一压缩泵相连，再通向离心管（图 3.1.2）。小室间的通道由一个阀门控制。为了形成线性梯度（最常用的一种类型），各小室有相同的交叉组合区，在一个小室中，不断地形成达到所需密度梯度中某个密度的溶液，这个小室有出口与离心管相通并有一个搅拌装置位于其中。一旦被泵出这个混合小室，液体就通过通道由储液小室流向混合小室，这样就能保证两个小室中的压力相同。接下来，在混合小室中溶液的密度逐渐发生改变。如果是较高密度的液体装在混合小室中，以较高密度为先的梯度就会产生；如果是较低密度的液体装在混合小室中，以较低密度为先的梯度就随之产生。值得注意的是，如果高密度在先，输送液体的位点就要在离心管最高液面以上；如果低密度在先，输送位点应在离心管的底部。

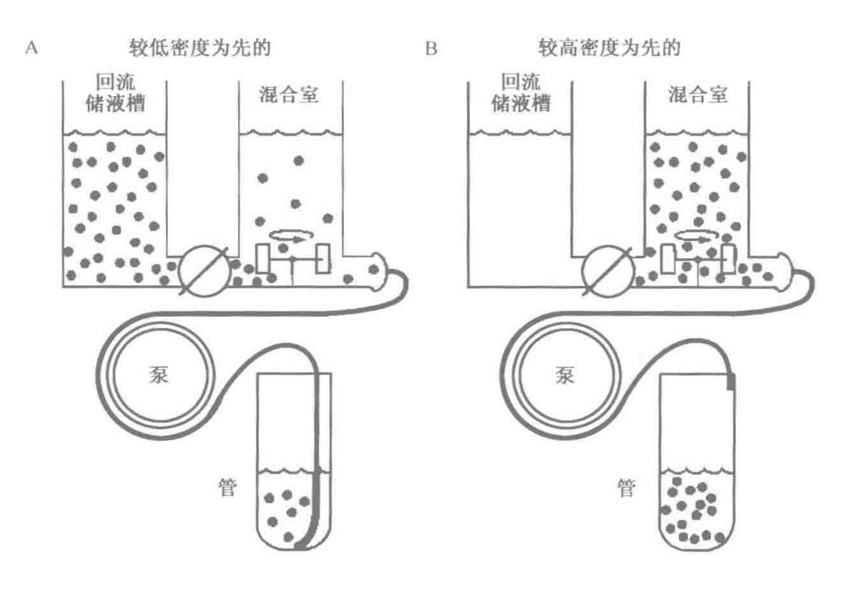


图 3.1.2 线形梯度形成装置显示了回流储液槽通过一带有阀门的通道与混合室相连一根输送管从混合室导出，与蠕动泵相连，最后进入离心管中。A. 较低密度溶液为先的输送过程示意图：较低密度溶液在混合室中，输出点位于离心管的底部。B. 较高密度溶液为先的输送过程示意图：较高密度溶液在混合室中，输出管一直位于加入管中液体表面的上方

梯度组分收集装置

梯度组分的收集是离心的收尾工作，需要一个有序的、可保持原有梯度的清空离心管的装置。从离心管的顶部或底部均可进行梯度组分的收集。容量合适的移液器（如 Pipetman Rainin）可用于手工操作，从顶部开始收集，需要谨慎操作，小心地从弯月形液面以下取出等量的分离组分。Buchler 将一种泵装置（Autodensiflow）投入市场，该装置能不断地调整达到弯月形液面的高度，并从液面顶部收集梯度组分，MSE Scientific 和 Nyegaard 两家的装置可以将梯度组分以上的高密度液体泵出并逐渐取代梯度组分，也是从离心管顶部开始收集。若是从离心管底部开始收集，用针头刺穿管底部，随后就能收集流出的成分了。

组分分离的介质

在离心技术发展的早期，该项技术作为提纯细胞器的工具，人们认识到不含电解质的溶液比电解质溶液更有利于减少细胞器聚集成团。尽管有些介质确实含有电解质（如STKM介质，含50mmol/L Tris・Cl，25mmol/L KCl，5mmol/L $MgCl_2$ 及0.25mol/L蔗糖），但是目前所用的绝大多数介质是不含电解质的。此外，所用的介质相对于0.15mol/L NaCl而言多为等渗或高渗的。细胞器都是渗透压计，水分子可以穿过包裹它们的膜保持渗透平衡，因此细胞裂解能发生在高渗介质中。

最常用于亚细胞组分分离的非电解质溶液为蔗糖。高质量的蔗糖（无RNase）价格确实不贵，易于溶解，而且它制备成的溶液能包含绝大多数生物细胞器的密度范围（表3.1.1）。此外，已经建立了在蔗糖溶液中分离绝大多数细胞器的技术。但是，蔗糖仍有局限性。较高浓度的蔗糖溶液非常黏而且是高渗的，等渗蔗糖溶液（0.25mol/L；约9% w/v）其密度仅为1.03g/ml，对于细胞器来说，这是较低密度的下限。因此所有以蔗糖为介质的等密度梯度离心，都是在高渗的条件下进行，细胞器内的水分子重新分布至其周围的介质中，使细胞器收缩、密度增加。对某些但不是全部细胞器而言，这种变化是可逆的。

在一些分离技术中，含糖的乙醇溶液常取代蔗糖溶液。甘油就是其中一种，虽然它的黏稠度比蔗糖的黏稠度低，但在同等浓度下其密度也比蔗糖低，也可以渗透至细胞器内。在一些不适宜使用蔗糖的程序中使用了甘露醇，例如，分离上皮细胞的刷状缘膜，其上含有蔗糖酶；在对酵母菌进行组分分离时常使用山梨醇，因为酵母菌分泌转化酵素（蔗糖酶的一种形式）。

多糖溶液也可以作为蔗糖溶液的替代品。Ficoll 400（Amersham Pharmacia Biotech）已被广为选用，它是蔗糖与表氯醇的化学聚合物，其平均分子质量为400 000（分子质量为70 000的产品也可用，如Ficoll 170）。在低浓度情况下，其渗透性很低，但如图3.1.3所示，浓度大于30%（w/v；密度约1.09g/ml）时，渗透性骤升，而且在高于10%（w/v）的任何浓度下，它都相当黏稠。Ficoll已经广泛用于分离不同的细胞群，而它最常用作添加剂，添加至包含其他密度-修饰试剂的介质中。

碘化的非电解质能增加组分分离介质的密度，使其最大范围地涵盖生物细胞器的密度，同时与蔗糖溶液相比还能保持适宜的黏稠度及渗透性。有三种应用最广泛、最相近的化合物：甲泛葡胺（metrizamide）、Nycodenz及iodixanol [OptiPrep；由Nyegword销售；Accurate Chemical（列于附录4中）由美国出口的]。如图3.1.3所示，40%（w/v）浓度的甲泛葡胺及Nycodenz密度为71.2g/ml（绝大多数细胞器的密度均高于它），渗透压≤400mOsm，而且有适宜的黏稠度。浓度为60%的Iodixonal，其密度为1.32g/ml，渗透压为260mOsm，黏稠度适中。这些条件使得该种介质特别适于在等渗条件下用于密度梯度离心。上述试剂具有如此多的优越性，为什么没有更广泛地应用？因为它们的价格不菲，这使得它们不能用于大规模操作。此外，它们还能吸收紫外线，并且有报道说它们能抑制某些酶的活性。

想得到高密度并且是低黏稠度及渗透压的另外一种选择是使用Percoll，用聚乙烯吡咯烷酮包被的硅胶能减少它对细胞器的吸附。为了分离细胞器，Percoll常与等渗的

蔗糖溶液联合使用，这是由于纯 Percoll 的渗透压仅为 10mOsm。如图 3.1.3 所示，含 Percoll 的介质其密度可以很高但仍能保持低黏稠度。由于 Percoll 颗粒有明显的大小（大小从 30～150Å，1Å＝10^{-10}m＝0.1nm）及密度差异，它们会在离心时沉下去。因此，在旋转时它能自动形成浓度梯度，而且沿管长轴侧向的密度会随时间的不同而改变。Percoll 所形成的低密度有利于分离那些密度差别较轻微的细胞器，但是为保证实验的可重复性，离心条件要细心设置。Percoll 也有它的局限性：它能吸收紫外线（UV），干扰蛋白质测定，在酸及有机溶剂中沉淀，因此不可尝试用三氯乙酸（TCA）和丙酮沉淀含 Percoll 的组分，这些沉淀是很难完全清除干净的。

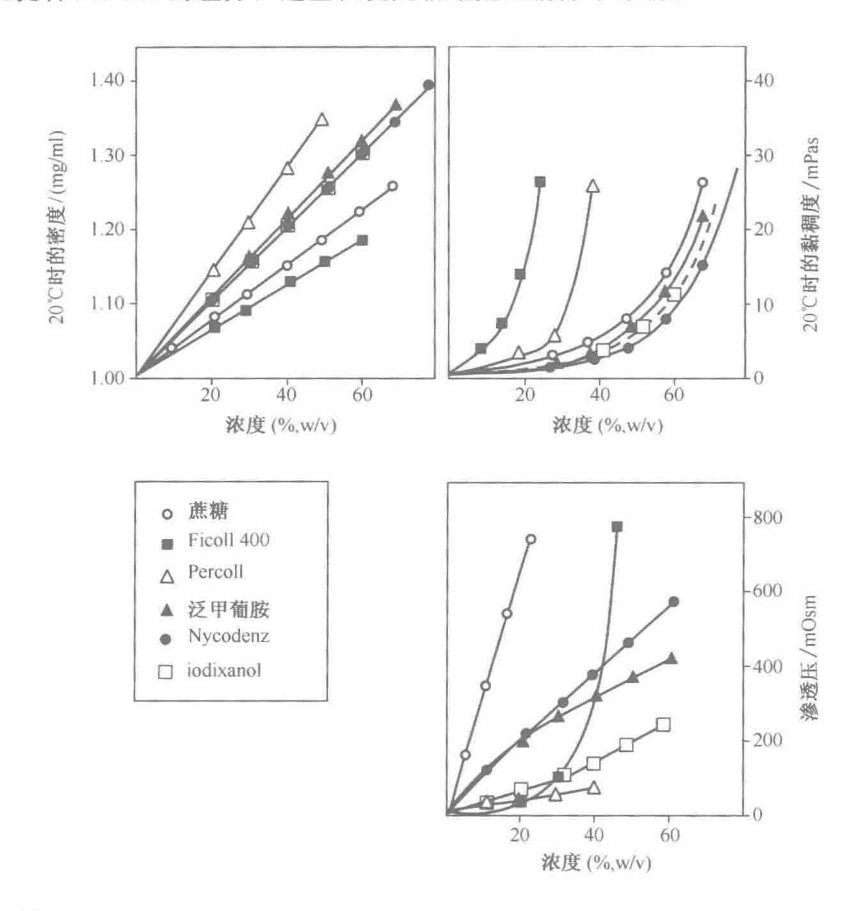


图 3.1.3　用于分离细胞器组分的梯度基液由于其浓度不同，可以表现出密度、黏稠度和渗透压等性质的不同

图中显示的是蔗糖、Ficoll 400、Percoll、泛甲葡胺、Nycodenz 和 iodixanol 的数据。授自 IRL 出版社许可，数据源于修改过的 Rickwood（1984）。Iodixanol 的数据授自 Nycomed Pharma AS Diagnostics（Nycomed Pharma　1996）

组分分离的评估

在建立一系列分离或纯化细胞器步骤的过程中，一定要对每个步骤进行评定以确定其结果是所需要的、稳定的。这意味着要做一系列实验检测标志物活性，检测蛋白质，

并且在整个过程中分析这两者的总体状况。这些细节可以使实验者评定匀浆物的产量、纯化程度以及由其他非所要的细胞器造成的污染，计算每一步骤得到产物的活性百分比。匀浆过程中细胞裂解的程度可以通过测定某种特异性细胞器的标志物活性组分来评定，这种细胞器在最初的低速离心过程中会沉降成团（其中可能包含未破坏的细胞）。细胞器的裂解程度可通过测定可溶性的细胞器内蛋白质的总量来评定，因为所有细胞器都通过高速离心沉降了，而这些蛋白质不会被沉降。整个纯化过程中对标志物活性的测定可以帮助实验人员评估所需产物的产量，如果对其他细胞器标志物也进行测定，还可以评估残留污染的程度。最后，如果同时测定蛋白质的浓度，就可以计算每一步骤中活性与蛋白质的比率（已知这种蛋白质的特殊活性），从而对纯化或浓缩的效率作出评价。如果说这种分析在准备性实验中用得更多，那对于确定某种特定细胞器的分布状况，就必须测定每个组分的标志性活性。最后，有一点很重要，那就是亚细胞组分分离不可能是完美无瑕的！不可能得到一个完全纯化的特定细胞器。事实上，“组分分离”这一术语包含了产量和纯化均不完全的意思。细心的实验者总是会认清这项技术及其结果的局限性。

关键性的步骤

在分离特定细胞器时应有一个良好的开始，这可能会有助于检查为获取目的细胞器而设计的实验步骤。有开拓精神的实验者可能会考虑使用新一代的 iodixanol（OptiPrep）试剂。在等渗条件件下的较大密度范围的分离操作，其可行性是很强的。在 iodixanol 中进行组分分离的示例步骤可以从 Nycomed/Accurate Chemical Co. 获取。

参考文献：Rickwood，1984

撰稿人：J. David Castle

单元 3.2　分离大鼠肝细胞质膜片层与浆膜结构域

极化的上皮细胞的质膜可以被分为不连续的结构域（顶部和基底部），这些结构域的功能不同。为检测肝细胞质膜的成分，就需要分离一定数量的该种细胞器。

基本方案 1　分离质膜片层

本方案介绍了快速并有效地从肝细胞中纯化质膜片层的方法。产量为总质膜量的 10%～20%，每克肝脏可得到 1mg 质膜，质膜标志物浓缩了 20～40 倍。

注意：在实验前要对所有的溶液及玻璃制品进行 4℃ 预冷处理，并始终保持在冰上。

注意：所有使用活体动物的方案都必须预先进行审核并得到动物使用及保护委员会（IACUC）的批准，必须执行政府有关实验室动物保护及使用的规定。

材料（带√项见附录 1）

125～150g 雄性 Sprague-Dawley 大鼠

乙醚

0.9%（w/v）NaCl，冰冷的（在 4℃中储存 1～2 周）

√0.25mol/L 及 0.2mol/L STM 溶液，冰冷的

√蛋白酶抑制剂

√0.25mol/L 蔗糖溶液，冰冷的

40ml 的 Dounce 匀浆器（Wheaton），配有紧密型及松弛型研磨棒（A 及 B 型，尽管有个别生产商将两种标签写反）

粗平布，等级 60

阿贝折射率仪（Bausch 及 Lomb）

7ml Dounce 匀浆器（Wheaton），配有松弛型研磨棒（B 型）

1. 125～150g 雄性大鼠禁食 18～24h。
2. 用乙醚将大鼠麻醉并用断头器处死。在冷的流动水冲洗下，排出大鼠体内的血并且小心地取出肝脏（约 6～8g）。
3. 用冰冷的 0.9% NaCl 溶液冲洗肝脏以清除残余的血液及毛。使用喷注瓶，将 0.9% NaCl 溶液通过门静脉灌注肝组织直至其变白。将灌注好的肝脏快速称重，并将其置于预冷处理的烧杯中，随后置于冰上。
4. 用剪刀将肝脏剪成约 0.5cm^3 小块并向其中加入 4.5 倍体积（4.5ml/g 组织）的 0.25mol/L STM 溶液，溶液中含蛋白酶抑制剂。将上述混合物倒入 40ml Dounce 匀浆器中。在 5min 内，使用松弛型研磨棒上下轻缓地搅动 10 次，其间不要产生气泡。擦去黏附在研磨棒上的结缔组织。
5. 用附有四层等级 60 的粗平布的漏斗过滤匀浆物，粗平布预先用 0.25mol/L STM 溶液润湿。加入 0.25mol/L STM 溶液来调整过滤液的体积至肝脏原初湿重的 5 倍（5ml/g），得到 20%（w/v）的匀浆液，缓慢搅拌 3～5 次。
6. 将 25～30ml 匀浆液（S1）倒入 50ml 锥形离心管中，4℃，260g 离心 5min，小心地将上清液（S1）倒入一新管中，防止少量松软的沉淀物一同进入新管内，将管置于冰上。
7. 用含有蛋白酶抑制剂的 0.25mol/L STM 溶液重新悬浮沉淀，其体积为原匀浆体积的一半（步骤 5），在 40ml Dounce 匀浆器内用松弛型研磨棒搅动 3 次。随后按步骤 6 条件进行离心。将离心后的上清液与步骤 6 中所得上清液（S1）混合。每个 50ml 锥形离心管中加入 25～30ml 混合的上清液，4℃，1500g 离心 10min。弃掉上清液（S2）。
8. 向沉淀（P2）中加入含蛋白酶抑制剂的 0.25mol/L STM 溶液，其体积为原匀浆体积的 2/3（步骤 5）。在 40ml Dounce 匀浆器中，用松弛型研磨棒（B）搅动 3 次，紧密型研磨棒（A）搅动 1 次，以此重新悬浮沉淀。将悬液倒入量筒中，用 2.0mol/L STM 溶液调整体积至 2 倍的匀浆体积（步骤 5）。缓慢地上下颠倒 3～5 次，混匀。

9. 用阿贝折射率仪检测混合液的密度，并用 0.25mol/L 或 2.0mol/L 的 STM 溶液调整体积直至密度达 1.18g/cm³（折射率＝1.4016）。
10. 在超速离心管中加入重新悬浮的 P2，体积约管容量的 90%。在每管的液面上小心地加上几毫升冰冷的 0.25mol/L 蔗糖溶液，用配有水平型转头的离心机，4℃，113 000*g*离心 60min，不使用刹车。
11. 用钝口的塑料移液管收集每一个离心管中的液面薄层，随后用 0.8～1.0 倍于原有匀浆液体积的（步骤 5）0.25mol/L 蔗糖溶液重新悬浮上述薄层，并在 40ml Dounce 匀浆器中用松弛型研磨棒反复搅动 3 次。
12. 检测悬液的密度，如果需要，就用 0.25mol/L 蔗糖溶液调整其体积至≤1.05g/cm³（折射率≤1.3500）。每个 50ml 离心管中加 25～30ml 的重悬浮薄层，4℃，1500*g* 离心 10min。
13. 用移液管小心移去上清液，每个肝脏加入 1～2ml 0.25mol/L 蔗糖溶液，在 7.0ml Dounce 匀浆器中使用松弛型研磨棒重新悬浮沉淀（质膜片层）。将纯化后的质膜片层分装，每管 0.5～1.0ml，保存于－80℃。
14. 向载玻片上滴约 20μl 重新悬浮的质膜片层，并在 25 倍相差显微镜下观察少量小空泡（≤1μm）、膜片段以及大量相对较大的（20～40μm）Y 形结构。
15. 取一定量的质膜片层，利用 SDS-PAGE（单元 7.1）及免疫印迹法（单元 7.7）检测其回收率和纯度；利用各种细胞内膜标记蛋白的特异性抗体来检测其免疫学活性（表 3.2.1）。通过光密度分析（单元 7.8）来确定免疫活性条带的分布状况。

表 3.2.1 分离质膜片层[a] 过程中，不同细胞器标志分子的回收率与浓缩倍数

标志物[b]	回收率/%	浓缩倍数
蛋白质	0.4±0.13	—
5′-核苷酸酶(PM)	17.4±6	39±10
碱性磷酸二酯酶Ⅰ(PM)	17.0±5.6	40±9
脱唾液酸糖蛋白结合活性(PM)	16.3±6	47.8±18
NADH-细胞色素 c 还原酶(ER)	0.3±0.2	1±0.5
葡萄糖-6-磷酸酶(ER)	0.5	0.8
β-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(溶酶体)	0.22±0.13	0.66±0.3
细胞色素氧化酶(线粒体)	0.12±0.07	0.22±0.1
DNA(核)	0.26	0.3
半乳糖基转移酶(高尔基体)	1.0	1.9

a. 上述数值是应用时的平均值±标准偏差值($n \geq 3$)，经洛克菲勒大学出版社复制许可，数据源于 Hubbard et al (1983)。

b. PM，质膜；ER，内质网。

支持方案 1 检测碱性磷酸二酯酶Ⅰ的活性

碱性磷酸二酯酶Ⅰ是一种与质膜连接的酶，它平均地分布于质膜的两个表面结构域之间。以生物化学法分析亚细胞组分，它是一个极好的显示总质膜量的标记物。

材料（带√项见附录 1）

制备的分离组分以及分离的质膜片层（见基本方案 1）

√碱性磷酸二酯酶Ⅰ反应缓冲液

5% 及 10%（w/v）三氯乙酸（TCA），冰冷的

2mol/L NaOH

含 0.25mmol/L 对硝基苯酚的 5%（w/v）TCA

1cm 光径的比色杯若干

1. 确定碱性磷酸酶Ⅰ反应缓冲液所需的体积：检测点的数量加上一个底物空白对照×0.8ml（0.2ml/检测管×4 管/组分分离物），新鲜制备。
2. 每份组分分离物设置 4 个相配的玻璃试管及底物空白对照管。在室温下，每管加 0.2ml 反应缓冲液。每种组分（在实验前将其置于冰上，如果需要，可将其稀释；见表 3.2.2）取 50μl 加至适当的样品管中并加 50μl 水至底物空白管中，轻度涡旋混匀。将组分分离物及空白对照置于 37℃水浴摇床中孵育，一半孵育 30min，一半孵育 60min。

表 3.2.2　分析质膜制备组分的建议稀释比例

分离组分	酶学实验稀释比例[a]	BCA 蛋白测定稀释比例[a]
H	1∶50；1∶100	1∶50；1∶100
S1	1∶25；1∶50	1∶25；1∶50
P1	1∶50；1∶100	1∶20；1∶40
S2	1∶20；1∶40	1∶25；1∶50
P2	1∶10；1∶20	1∶5；1∶10
I	1∶10；1∶20	无需稀释；1∶2
1.18g/m³	1∶2；1∶4	1∶2；1∶4
P3	1∶5；1∶10	1∶50；1∶100
S3	1∶2；1∶4	无需稀释
PM	1∶50；1∶100	1∶5；1∶10

a. 在上表中，“1∶50”代表 50 份体积溶液中有 1 份体积的酶(即 1 体积的酶添加 49 体积的稀释液)。

3. 加入 0.25ml 冰冷的 10% TCA，终止反应。轻度涡旋搅拌，置于冰上。每管加 1.5ml 2mol/L NaOH，轻度涡旋搅拌。使用 1cm 比色杯进行 A_{400} 读数。
4. 分别将 0、0.1、0.25、0.3、0.4 及 0.5ml 含 0.25mmol/L 对硝基苯酚的 5% TCA 加至双份管中（相当于每管含 0、25、62.5、75、100 及 125nmol 对硝基苯酚）。用 5% TCA 定容，每管调至 0.5ml。每管中加入 1.5ml 2mol/L NaOH，如步骤 3 所示读 A_{400}。
5. 以 A_{400} 及对硝基苯酚的量绘制成标准曲线，每一份样品的吸光读数值减去底物对照的吸光读数值。从标准曲线中确定每管中释放的对硝基苯酚的量。
6. 计算酶活性（被水解底物的微摩尔数/h/ml）：样品管中对硝基苯酚的微摩尔数×20（纠正样品容量至 1.0ml）、×2（只针对孵育 30min 的样品，纠正其作用时间至 1h）

以及×1/稀释度（若在加样前用 50μl 样品做稀释）。

基本方案 2　分离质膜结构域

上述分离制备的质膜片层（见基本方案 1）可作为分离顶部及基底结构域的原材料，这两部分结构域组成了完整的肝细胞膜。

材料（带√项见附录 1）

质膜片层（见基本方案 1）
√0.25、0.46 及 1.42mol/L 蔗糖溶液
√蛋白酶抑制剂溶液
抗细胞膜顶部及基底部结构域的特异性抗体（例如，针对顶部结构域的抗二肽肽酶 IV 抗体，针对基底部结构域的 CE9 抗体；Hubbard et al. 1985）
超声水浴（如 Laboratory Supplies）
蠕动泵
梯度制备仪
阿贝折射率仪（Bausch and Lomb）

1. 用含蛋白酶抑制剂的 0.25mol/L 蔗糖溶液稀释纯化的质膜片层至 1.0mg/ml。使用含冰水混合物的超声水浴机，超声处理 2.0ml 上述溶液，该溶液置于 15ml 锥形管中。在冰上，先进行 10s 超声冲击，再间隔 1min，如此反复。每 1～5 次冲击后（共 3～20 次），用相差显微镜（25 倍；见基本方案 1，步骤 14）观察起泡情况。
2. 制备线性梯度蔗糖溶液，从 0.46～1.42mol/L。将成泡状的质膜片层置于梯度溶液之上，与溶液表面相距 2～5mm。4℃，72 000g 离心 16～20h，不使用刹车。
3. 收集适当体积的分离组分。用与该组分相同体积的 0.25mol/L 蔗糖重新悬浮沉淀。将组分与蔗糖溶液混匀并用阿贝折射率仪测量其折射率，将不确定的组分存于 −80℃。
4. 用 SDS-PAGE 确定顶部及基底部膜蛋白的分布情况（单元 7.1），用特异性抗体进行免疫印迹分析（单元 7.7）（例如，抗二肽肽酶 IV 的抗体针对顶部质膜，CE9 抗体针对基底部质膜），随后对免疫活性条带进行光密度分析（单元 7.8）。

支持方案 2　K^+ 激活的对硝基苯酚磷酸酯酶活性测定实验

在极化的上皮细胞中，K^+ 激活的对硝基苯酚磷酸酯酶的活性主要与基底膜有关。

材料（带√项见附录 1）

结构域梯度组分及重悬的沉淀组分（见基本方案 2）
√对硝基苯酚磷酸酯酶缓冲液，包含或不含 K^+
√底物混合物

1mol/L 和 10mol/L NaOH

0.25mmol/L 对硝基苯酚溶于 1mol/L NaOH

1cm 光径比色杯

1. 确定有 K^+ 及无 K^+ 对硝基苯酚磷酸酯酶反应缓冲液所需的体积：检测点的数量加上一个底物空白对照×3.28ml（0.82ml/检测管×4 管/组分分离物），新鲜制备这两种反应缓冲液。
2. 每份组分分离物准备 8 个合适的玻璃试管及底物空白对照管，每种缓冲液各加 4 管，每管加 0.82ml。将两种不同的反应缓冲液分别加入 4 个底物空白对照管中，每管 0.87ml。每个梯度组分和沉淀组分（在实验前将其置于冰上，如果需要，可将其稀释；见表 3.2.2）各取 50μl 加至适当的样品管中，轻度涡旋混匀。在所有样品管及空白对照管中各加 30μl 底物混合液以起始反应。将它们置于 37℃水浴摇床中孵育，一半孵育 30min，一半孵育 60min。
3. 加入 100μl 10mol/L NaOH 来终止反应，涡旋混匀。使用 1cm 光径比色杯读取 A_{405}。
4. 分别将 0、0.1、0.25、0.3、0.4 及 0.5ml 含 0.25mmol/L 对硝基苯酚的 1mol/L NaOH（相当于每管含 0、25.0、62.5、75、100 及 125nmol 对硝基苯酚）加至双份管中。用 1mol/L NaOH 定容，每管调至 1.0ml，如步骤 3 所示读取 A_{405}。
5. 以 A_{405} 及对硝基苯酚的量绘制标准曲线。每份样品的吸光读数减去底物对照的吸光读数。从标准曲线中确定每管中释放的对硝基苯酚的量。
6. 计算酶活性（被水解底物的微摩尔数/h/ml）：样品中对硝基苯酚的微摩尔数×20（纠正样品容量至 1.0ml）、×2（只针对孵育 30min 的样品，纠正其作用时间至 1h）以及×1/稀释度（若在加样前用 50μl 样品做稀释）。
7. 用无 K^+ 缓冲液体系所测得的数值减去用含 K^+ 缓冲液体系所测得的数值，就可以确定 K^+ 激活对硝基苯酚磷酸酯酶（基底膜结构域的标记物酶）的活性。

支持方案 3　5′-核苷酸酶活性测定实验

5′-核苷酸酶是一种与质膜相关的酶，在许多极化的上皮细胞中仅分布于顶部结构域。

材料（带√项见附录 1）

结构域梯度分离组分及重悬的沉淀分离组分（见基本方案 2）

√5′-核苷酸酶反应缓冲液

5%及 30%（w/v）三氯乙酸，冰冷的

10%（w/v）抗坏血酸，新鲜配制

√0.42%（w/v）钼酸铵盐

0.1mmol/L KH_2PO_4，溶于 10%（w/v）的 TCA 溶液

1cm 光径的比色杯

1. 确定 5′-核苷酸酶反应缓冲液的体积：检测点的数量加上一个底物空白对照×1.8ml (0.45ml/检测管×4 管/组分分离物)，新鲜制备。
2. 每种组分分离物及底物空白对照准备 4 个合适的玻璃试管，每管中加 0.45ml 反应缓冲液。每种梯度组分（在实验前将其置于冰上，如果需要，可将其稀释；见表 3.2.2）取 50μl 加至适当的样品管中，并取 50μl 水加至底物空白管中，轻度涡旋混匀。将组分分离物及空白对照置于 37℃水浴摇床中孵育，一半孵育 30min，一半孵育 60min。
3. 加入 0.1ml 冰冷的 30% TCA 溶液以终止反应，涡旋混匀，将样品置于冰上。
4. 将一份 10%抗坏血酸与六份 0.42%钼酸铵（AA/AM）混合。向管中加入 1.5mlAA/AM 混合液，用铝箔封口，45℃再孵育 20min。
5. 用 1cm 光径比色杯读取 A_{750}。
6. 分别将 0、0.5、0.1、0.2、0.3 及 0.4ml 含 0.1mmol/L KH_2PO_4 的 10% TCA 溶液（0、5、10、20、30 及 40nmol PO_4/管）加入双份管中。用 5% TCA 溶液定容，每管调至 0.6ml。每管中加入 1.5ml AA/AM 混合液并如步骤 2 所示于 45℃中孵育。
7. 如步骤 5 所示读取 A_{750}。以 A_{750} 读数对 PO_4 的量作标准曲线图。每份样品的吸光读数减去底物对照的吸光读数。从标准曲线中确定每管中释放的 PO_4 的量。
8. 计算酶活性（被水解底物的微摩尔数/h/ml)：样品中 PO_4 的微摩尔数×20（纠正样品容量至 1.0ml)、×2（只针对孵育 30min 的样品，纠正其作用时间至 1h）以及×1/稀释度（若在加样前用 50μl 样品做稀释)。

支持方案 4　间接免疫荧光法检测与质膜片层相连的蛋白质

可通过间接免疫荧光法检测纯化的质膜片层，从而确定两种结构域之间存在的与质膜相关的分子的分布状况。有关间接免疫荧光检测法的讨论见单元 5.3。

材料（带√项见附录 1)

质膜片层（见基本方案 1)
√0.25mol/L 蔗糖溶液
√PBS
甲醇，预冷至－20℃
PBS/1%（w/v）BSA，新鲜制备
针对标志蛋白的一抗
PBS/2%（w/v）BSA，新鲜制备
针对一抗 Ig 的经荧光素标记的二抗
苯二胺封片介质
指甲油
22mm×22mm 盖玻片

1. 用 0.25mol/L 蔗糖溶液稀释质膜片层至 1.0mg/ml。加入 100～200μl 溶液至 22mm ×22mm 盖玻片上，用吸液器的吸头将它均匀涂于玻片表面。在室温下放置约 20～30min 使质膜片层在重力作用下附着于盖玻片上。
2. 将盖玻片快速浸入盛有 PBS 的小烧杯中 10 次，以洗去未附着的质膜片层。将盖玻片边缘轻触纸巾以吸去多余的液体。
3. 快速地将盖玻片置于预冷（－20℃）的甲醛中，在－20℃孵育 5min。将盖玻片从甲醛中取出，用 PBS 反复洗 3 次，每次 5min，重新水化。
4. 将质膜片层与 PBS/1% BSA 共孵育 5min 以达到封闭的作用。如步骤 2 所示弃去多余的封闭液，再加入 100μl 含所需一抗的新鲜 PBS/1% BSA，孵育 30min。
5. 用 PBS/0.2% BSA 洗 3 次盖玻片，每次 5min，如步骤 2 所示弃掉多余的清洗缓冲液。加入 100μl 含所需浓度的荧光素标记的二抗的 PBS/1% BSA，孵育 15min。
6. 如步骤 5 所示洗盖玻片。
7. 在载玻片中央滴一滴苯二胺封固液。将盖玻片上有质膜片层的一面贴在苯二胺液面之上。
8. 用滤纸触及盖玻片以吸去多余的液体。用指甲油将盖玻片封在载玻片上。至少让标本晾干 15min，再在荧光显微镜下进行观察，要将物镜调至 63 倍或 100 倍。

参考文献：Hubbard and Ma，1983；Hubbard et al.，1983

撰稿人：Pamela L. Tuma and Ann L. Hubbard

单元 3.3 利用差速及密度梯度离心法从组织和细胞中分离 Golgi 膜

在分泌活跃的组织中，Golgi 膜是一种主要的特定细胞器，只要采用尽量温和的破坏组织的方法，就很容易分离出 Golgi 膜，这样的方法也使破碎的 Golgi 复合物最少。按照常规，只要 Golgi 膜能保持其管状结构，那么以10 000～15 000*g*的速度离心 10～20min，就能将其沉淀下来，这样就可以通过悬浮于不连续蔗糖梯度溶液中，将 Golgi 膜从轻线粒体组分中分离出来（见表 3.3.1）

表 3.3.1 蔗糖溶液和 iodixanol 中大鼠肝脏膜分离组分的密度（单位：g/ml）

颗粒	在蔗糖溶液中的密度	在 iodixanol 中的密度
细胞核	＞1.32	1.23～1.25
过氧化物酶体	1.19～1.23	1.18～1.21
粗面内质网	1.18～1.26	1.14～1.20
线粒体	1.17～1.21	1.14～1.16
溶酶体	1.19～1.20	1.11～1.13
光面内质网	1.10～1.17	1.08～1.12
高尔基体	1.07～1.12	1.04～1.07
质膜	1.07～1.14	1.02～1.03

注意： 所有使用活体动物的方案都必须预先进行审核并得到动物使用及保护委员会（IACUC）的批准，必须执行政府有关实验室动物保护及使用的规定。

注意： 所有的溶液、玻璃器械、离心管及仪器必须在0～4℃条件下预冷，并且要始终置于冰上。离心转头也必须预冷至相同温度。

注意： 蛋白酶抑制剂（见配方）可添加至某个或所有溶液中。

基本方案1　利用蔗糖密度筛从大鼠肝脏中快速分离Golgi膜

利用含右旋糖酐的匀浆介质及匀浆过程的机械剪切力对抗液体的剪切力，更有利于保留完整的Golgi复合物。

材料（带√项见附录1）

150～200g Sprague-Dawley大鼠
√DHM
√1.2mol/L蔗糖密度筛
√HM，可选用
从黄曲霉菌（*Aspergillus oryzae*）（Sigma Aldrich Co.）中粗提的X-A型α-淀粉酶，可选用
从大麦中提出的VIII-A型α-淀粉酶（Sigma Aldrich Co.），可选用
解剖工具，包括剪刀、刀片、镊子
Polytron匀浆器（Brinkmann Instrument）
相差显微镜
高速离心机，配有水平型转头及30～50ml洁净的塑料管
10ml注射器及长的金属套管（内径约1mm）或与抽气装置相连的巴斯德吸管
玻璃棒
超速离心机，配有水平型转头（Beckman SW 28.1，Sorvall AH629或同类产品）以及17ml离心管

1. 150～200g Sprague-Dawley大鼠禁食过夜，拉颈或断头处死。
2. 打开腹腔，取出肝脏转移至含约20ml DHM的预冷烧杯中。记录肝脏重量。吸去培养基并用剪刀或刀片将肝脏切割成小于25mm^{3}的小块。用约20ml DHM悬浮肝脏碎块。
3. 将悬液至于冰上，并用Polytron匀浆器以10 000r/min（设置1）的转速搅动40s，以搅动10s、间歇10s的方式进行。用相差显微镜检查组织是否破碎完全。
4. 4℃，5000g离心15min，不使用刹车。用带有长金属套管或附带有抽吸装置的巴斯德吸管非常小心地吸去上清。保留0.5～1.0ml上清于其内。
5. 用玻璃棒缓慢搅拌含残留上清液的两种组分构成的沉淀，使上层的黄棕色部分重新悬浮起来。
6. 使用注射器与套管将重新悬浮的Golgi材料移至10ml量筒中。用DHM调整悬液浓

度至每10g肝组织6ml，于17ml离心管中将其铺在2倍体积的1.2mol/L蔗糖密度筛上，用超速离心机于4℃，120 000*g*离心30min。

7. 用一个新的注射器与套管于液面收集Golgi膜。如果有必要，用≥2倍体积的DHM（或HM）将其稀释，并在4℃，10 000*g*离心20min。
8. 测定蛋白质的浓度（附录3B），以DHM重新悬浮沉淀至1～5mg/ml。
   如果下一步要试图溶解Golgi膜的各种结构域，必须水解右旋糖酐以使Golgi复合物解聚。
9. 将4～5ml Golgi膜悬液与3mg源自黄曲霉菌的粗提的X-A型α-淀粉酶和3mg源于大麦的III-A型α-淀粉酶混合，于4℃共孵育45min。
10. 用巴斯德吸管（头部内径约1mm）或是带金属套管的注射器反复抽吸、排出悬液（5或6次），利用轻缓的液体剪切力使Golgi复合物完全解聚。

基本方案2　将大鼠肝脏提取的轻线粒体组分悬浮于非连续的蔗糖梯度液中来分离Golgi膜

如果使用右旋糖酐来保持Golgi复合物的堆积形式不易实现的话，那么，使用从肝脏匀浆物中获得的轻线粒体组分来分离，可以克服许多与高尔基体破碎相关的困难。

材料（带√项见附录1）

150～200g Sprague-Dawley大鼠

√HM

√2.0、1.33、1.2、1.1、0.77及0.25mol/L蔗糖梯度溶液

解剖工具，包括剪刀或刀片

Potter-Elvehjem匀浆器，间隙约0.09mm，工作体积40ml（Fisher Scientific），配有预冷的研磨棒

高架的高扭矩电动马达，半导体闸流管控制（Fisher Scientific）

低速离心机，配有水平型转头以及50ml离心管

5～30ml的Dounce匀浆器（Wheaton），配有松弛B型锥形研磨棒

高速离心机，配有8×50ml固定角度型转头（如Sorvall SS34）

10ml注射器及金属套管

折射率计

超速离心机，配有水平型转头（Beckman SW 28.1，Sorvall AH629或同类产品）以及17ml离心管

1. 150～200g Spargue-Dawley大鼠禁食过夜。将大鼠拉颈处死或断头处死。
2. 打开大鼠腹腔，取出肝脏（10～20g）置于含约20ml HM的预冷烧杯中。吸出培养基，用剪刀或刀片将肝脏切割成小于25mm³的小块。
3. 用约40ml HM悬浮上述碎块并将一半的悬液转移至Potter-Elvehjem匀浆器的玻璃管中，将预冷的研磨棒与高架的高扭矩电动马达相连，研磨棒上下磨动4或5次，

对小块肝组织进行匀浆，转速为500r/min。

4. 将匀浆物倒入一烧杯中并置于冰上，用HM清洗匀浆器，洗净研磨棒以清除任何黏附的结缔组织。重复上述过程处理另一半悬液。
5. 将匀浆物置于50ml锥形离心管中，在低速离心机中，4℃，1000g离心10min沉淀胞核。吸去上清液后置于冰上。
6. 将胞核沉淀溶于约20ml HM中并倒入约30ml Dounce匀浆器内。使用松弛型研磨棒温和地搅动4次以悬浮沉淀。将悬液置于干净的50ml管中，4℃，1000g离心10min。
7. 将步骤5与6的上清液合并，4℃，3000g离心10min，沉淀出重线粒体组分。将上清移至干净的50ml管中，在4℃条件下，17 000g高速离心20min。使用10ml注射器及金属套管吸弃上清液。
8. 用1～2ml HM重新悬浮轻线粒体沉淀，涡旋混匀。随后加入8ml 2.0mol/L蔗糖梯度溶液（终浓度约1.55mol/L）。将其置于5ml Dounce匀浆器中，使用松弛型研磨棒温和地磨动。
9. 使用折射率计检查其折射率应为1.4080，如果需要，用HM或2.0mol/L蔗糖溶液调整。
10. 将5ml轻线粒体组分悬液移至17ml离心管中，在其液面依次铺上以下蔗糖梯度溶液：

    4.0ml 1.33mol/L蔗糖溶液
    2ml 1.2mol/L蔗糖溶液
    2ml 1.1mol/L蔗糖溶液
    2ml 0.77mol/L蔗糖溶液
    0.25mol/L蔗糖溶液补足

11. 4℃，100 000g超速离心1h。收集位于0.77mol/L/1.1mol/L、1.1mol/L/1.2mol/L蔗糖溶液交界处的产物及任何界面的物质。如果需要，用≥0.2mol/L HM稀释分离组分，并在4℃以10 000g离心20min。
12. 测定蛋白质浓度（附录3B），用HM重新悬浮沉淀至1～5mg/ml。

基本方案3 将培养的细胞悬浮于非连续的蔗糖梯度液中来分离Golgi膜

此方案适合于任何在等渗蔗糖介质中的细胞匀浆（主要为培养的细胞）。

材料（带√项见附录1）

培养的细胞
√HM
√0.8、1.2、1.6及2.0mol/L蔗糖梯度溶液
滚珠挤压式匀浆器
5ml注射器及金属套管

超速离心机，配有水平型转头（Beckman SW 28.1，Sorvall AH629 或同类产品）及 17ml 离心管，4℃

1. 用 5ml HM 洗 1×10^8～3×10^8 个培养的细胞 2 次，用 3ml HM 重新悬浮，在滚珠挤压式匀浆器中搅 5 次。也可以在 Dounce 匀浆器中使用紧密型研磨棒（间隙 0.025～0.075mm）磨动 10～15 次。
2. 加入 2 倍容积的 2.0mol/L 蔗糖梯度溶液使匀浆物成为 1.4mol/L 蔗糖梯度溶液。将 6ml 上述溶液加入约 17ml 离心管中，在样品上铺 6ml 1.2mol/L 蔗糖梯度溶液及 3ml 0.8mol/L 蔗糖梯度溶液，再用 5ml 注射器及金属套管将 2ml 1.6mol/L 蔗糖梯度溶液置于样品的底部。
3. 在 4℃，以 110 000*g* 超速离心 2h。收集位于 0.8mol/L/1.2mol/L 蔗糖梯度溶液界面的 Golgi 复合物条带。如果需要的话，用≥2.0 倍体积的 HM 稀释提取物并以 100 000*g*，4℃离心 30min。
4. 测定蛋白质浓度（附录 3B），并以 HM 重新悬浮沉淀至 1～5mg/ml。

基本方案 4 用自发形成梯度的 IODIXANOL 梯度液从肝细胞微粒体组分中分离 Golgi 膜

这是一种利用大鼠肝细胞的微粒体组分进行光面内质网和粗面内质网（SER 和 RER）的组分和亚组分分离的快速方法。

材料（带√项见附录 1）

95% O_2/5% CO_2 混合气体
DMEM/BSA：含 1.0%（w/v）BSA 的 DMEM 培养基（见配方）
胶原酶制备的大鼠肝细胞（Plonne et al. 1999）
√PBS，4℃
10mmol/L HEPES-NaOH 缓冲液，pH7.8
√HB
√SB
OptiPrep（Axis-Shield，Life Technologies，Accurate Chemical）
30%（w/v）iodixanol：1∶1（v/v）OptiPrep/SB
15%（w/v）iodixanol：1∶3（v/v）OptiPrep/SB

低速离心机，配有水平型转头及 50ml 锥形管，均置于 4℃
约 10ml Dounce 匀浆器（Wheaton），配有紧密 A 型研磨棒
高速离心机，配有固定角度型转头及 17ml 管（如 Sorvall SE12），4℃
配有以下转头的超速离心机，所有均置于 4℃：
固定角度型转头（如 Beckman 50Ti，SorvallT865.1）及 10ml 离心管
垂直型转头（如 Beckman VTi 65.1，Sorvall 65V13）；近垂直型转头（如 Beck-

man NVT65）及 11ml 密封管；或小角度固定角度型转头（约 20°，如 Beckman 50.3Ti）及 5ml 可密封超速离心管。

约 10ml 的 Dounce 匀浆器（Wheaton），配有松弛 B 型研磨棒

梯度液取样器（上行移置型，如 Axis-Shield）

1. 将 95% O_2/5% CO_2 混合气体通入 DMEM/BSA 中 20min，然后用该培养基悬浮胶原酶制备的大鼠肝细胞，浓度为 $0.5\times10^7\sim1\times10^7$ 个/ml。在带有连续通气的摇动孵育器中孵育 30min 或更长时间。
2. 将细胞移至已称重的 50ml 锥形管内，4℃，800g 低速离心 2min 以沉淀细胞。弃掉上清液并记录细胞沉淀的重量。
3. 在 4℃，用约 20ml PBS 洗细胞沉淀 2 次。洗最后一遍后吸去所有 PBS，用 10mmol/L HEPES 缓冲液重悬细胞（5ml/g）。在 4℃，使细胞膨胀约 10min，随后在 4℃以 800g 的速度低速离心 2min 以沉淀细胞。
4. 吸去并弃掉 70%的缓冲液，随后加入与残留上清液等体积的 HB。重悬细胞，并在 10ml Dounce 匀浆器中用紧密型研磨棒磨动 30 次。
5. 将匀浆物移至一个 15ml 离心管内，加入蛋白酶抑制剂（如果需要）。使用高速离心机，将匀浆物在 4℃以 8000g 的速度离心 20min。
6. 将上清液移至一个 10ml 管内，使用配有固定角度型转头的超速离心机，4℃，150 000g离心 40min 以沉淀微粒体。加入 SB（每克细胞约加入 2.5ml），在 10ml Dounce 匀浆器中用松弛型研磨棒研磨以重悬微粒体。
7. 将 4 倍体积的微粒体悬液与 2 倍体积的 OptiPrep [iodixanol 的终浓度为 20%(w/v)] 混合。将 4.5ml 混合液移至一个适用于垂直型转头、近垂直型转头、小角度固定角度型转头的约 11ml 可密封管内。在液面下铺 1.8ml 30%的 iodixanol，在液面以上铺 4.5ml 15%的 iodixanol。封好管，4℃，350 000g离心 2h。
8. 用梯度取样器收集梯度液，上行移置约 0.5ml 分离组分，放入 1ml 样品管内。

   Golgi 带位于梯度液的顶端 7ml，光面内质网在中间 8～14ml 的位置，粗面内质网在管底部第三部分。
9. 如果需要的话，用≥2 倍体积的 SB 稀释 Golgi 组分（梯度液的顶部 7ml），并在 4℃以100 000g的速度离心 30min。
10. 测定蛋白质浓度（附录 3B），并用 SB 重悬沉淀达 1～5mg/ml。

支持方案　测定 UDP-半乳糖半乳糖基转移酶

Golgi 复合物的结构域（顺面膜囊、中间膜囊、反面膜囊）具有对糖蛋白及蛋白聚糖中寡糖残基进行翻译后修饰的功能。所以，任何具有此种功能的酶都可以作为标志物。最为常用的标志酶是 UDP-半乳糖半乳糖基转移酶（UDP-galactose galactosyltransferase），它实际上是 Golgi 复合物反面膜囊的标记酶，但是在制备完整 Golgi 复合物膜的过程中，可作为这些膜结构的常规标志物。

注意：使用具放射性的物质（UDP-gal）时，注意避免对实验人员及环境的污染。

实验操作及废料的丢弃应在一个指定区域进行，要依据当地放射防护部门所提供的操作指南行事。

材料（带√项见附录1）

10%（w/v）三氯乙酸（TCA）
√Acceptor 溶液
√UDP-gal 溶液
2.4cm 滤纸盘
聚氯乙烯板
大头针

1. 每个样品要准备两张2.4cm滤纸盘（轻轻地用铅笔标上号码）。用大头针将滤纸盘固定于聚氯乙烯板上，并确认滤纸盘未接触板面。
2. 在烧杯中放入250ml 10% TCA，置于冰上。
3. 将0.5ml管置于冰水浴中，取50μl acceptor 溶液与50μl样品混合，加入10μl的UDP-gal溶液。
4. 在零时及在37℃孵育20min之后，取50μl孵育的混合液分别倒在滤纸上。将滤纸放入冰冷的10% TCA溶液中，保持2～3h，其间不时地旋转滤纸。
5. 用蒸馏水洗滤纸若干次，随后在室温下晾干过夜。
6. 用任何一种适合于非液态样品的闪烁液统计放射活性。

参考文献：Axis-Shield，2000；Graham，1997；Graham et al.，1994

撰稿人：John M. Graham

单元3.4 利用差速离心及密度梯度离心从组织及细胞中分离溶酶体

溶酶体是研究较多的细胞器，是细胞内膜与质膜表面之间膜泡复杂转运的一个完整体系。最引人注意的是，溶酶体是细胞内吞大分子的降解部位。

注意：所有的溶液、玻璃器械、离心管及仪器必须在0～4℃条件下预冷，并且要始终置于冰上。离心转头也必须预冷至相同温度。

注意：蛋白酶抑制剂（见配方）可添加至某个或所有溶液中。

注意：所有使用活体动物的方案都必须预先进行审核并得到动物使用及保护委员会（IACUC）的批准，必须执行政府有关实验室动物保护及使用的规定。

基本方案1 使用自发形成梯度的PERCOLL梯度液从大鼠肝脏中分离溶酶体

对于哺乳动物组织的匀浆物，溶酶体总是从轻线粒体组分（LMF）中纯化获得，

此法有时也可用于从培养细胞匀浆物获得溶酶体。

材料（带√项见附录1）

150～200g Sprague-Dawley 大鼠
√匀浆培养基（HM）
√Percoll 储存液
解剖工具
40ml 及 5ml Dounce 匀浆器，配有松弛型 Wheaton B 型研磨棒（如 Kontes）
低速离心机，配有 50ml 离心管的水平型转头
Sorvall RC 系列离心机及 SE-12 和 SS-34 转头或同类产品
梯度取样器：纤细的金属套管与一个蠕动泵相连
超速离心机，配有固定角度型的转头（如 Beckman 50 Ti 或 70.1Ti 或 Sorvall T-865.1）

1. 动物禁食过夜，拉颈或断头处死。
2. 打开动物腹腔，取出肝脏置于一个含约 20ml 匀浆培养基（HM）的预冷烧杯中。吸去培养基，用剪刀将肝脏切成小于 $25mm^3$ 的碎块。用约 40ml HM 悬浮碎块，在 40ml Dounce 匀浆器中，用 B 型研磨棒研磨 15～20 次，使碎块研成匀浆。

   脑组织要置于 3 倍体积含高蔗糖浓度（0.32mol/L）的 HM 中，使用 50ml Potter-Elvehjem 匀浆器（间隙 0.2mm），500r/min 轻轻研磨 5 次。对于肾组织需使用 9 倍体积的 HM（0.25mol/L 蔗糖溶液），在 Potter-Elvehjem 匀浆器中研磨。
3. 使用带水平型转头的低速离心机，在 0～4℃条件下，以 750*g* 的速度将匀浆物离心 10min，吸出并保留上清液。
4. 用玻璃棒在 20ml HM 中粗略地悬浮沉淀。在 Dounce 匀浆器中，用 B 型研磨棒研磨 3 或 4 次以完全重悬沉淀。重复步骤 3。
5. 将上清液混合（去核后上清液；PNS），移入 50ml 高速离心管中。使用 Sorvall RC 系列离心机及 SS-34 固定角度型转头或同类产品，在 0～4℃条件下，以 20 000*g* 的速度离心 10min，吸弃上清液。
6. 以 40ml HM 悬浮轻线粒体沉淀（LMP），先用玻璃棒搅动，再在 Dounce 匀浆器中用研磨棒轻轻研磨 3 或 4 次。4℃，20 000*g* 离心 10min，吸弃上清液。
7. 以 6ml HM 重新悬浮 LMP，用玻璃棒搅动，再在 5ml Dounce 匀浆器中用研磨棒轻缓地研磨 3 或 4 次以完全重悬沉淀（轻线粒体组分；LMF）。
8. 将 4.5ml Percoll 储存液与步骤 7 中所得的 5.5ml LMF 混合。取 10ml Percoll 与 LMF 的混合液移入高速离心管中，使用 Sorvall SE-12 固定角度型转头或同类产品，在 0～4℃下，以 35 000*g* 的速度离心 90min，并采用慢减速程序。

   对于脑组织，将 4ml LMF 覆于 36ml 27%（v/v）Percoll 溶液之上，以 20 000g 离心 90min。对于肾溶酶体，将 LMF 与 Percoll 储存液混合达到 40%（v/v）的 Percoll 浓度，并以 47 000g 离心 30min。见表 3.4.1 中所提供的培养细胞需要的条件。

9. 用梯度液取样器从顶部开始收集梯度组分（最好是密度末端为先），每份约 1ml；溶酶体带位于管底的 1～2ml。
10. 在 0～4℃条件下，以 100 000g 超速离心上述组分 1h，并收集位于 Percoll 沉淀上层的包含溶酶体的混浊层。
11. 分离制备完成后尽快对溶酶体（见支持方案 1 及 2）、过氯化物酶体（单元 3.7）、线粒体（单元 3.6）或内质网（单元 3.7）进行代谢功能的检测。

表 3.4.1 特定的培养细胞的 Percoll 溶液离心条件

细胞类型	Percoll 溶液/%(v/v)	体积/ml	RCF/时间	参考文献
人成纤维细胞	27	35	35 000g/60min	Kelly et al.，1989. Eur. J. Cell Biol. 48:71
	34	10	17 500g/35min	Pisoni et al.，1987. JBC 262:610
巨噬细胞	35	7.5	62 500g/40min	Muno et al.，1990. Eur. J. Cell Biol. 191:91
	27	30	15 000g/60min	Lipman et al.，1990. JBC 265:2142
猴 COS 细胞	36	12	35 000g/90min	Finley and Kornfeld，1994. Eur. J. Biol. Chem. 259:31259
大鼠肝细胞	27	10	25 000g/40min	Akasaki et al.，1993. J. Biochem 114:598

基本方案 2 利用自发形成梯度的 PERCOLL 梯度液从培养的人 HL-60 细胞中分离溶酶体

培养细胞匀降物的去核后上清可用于分离溶酶体。

材料（带√项见附录 1）

在匀浆培养基中的 HL-60 细胞（ATCC ＃CCL-240）
√磷酸缓冲盐溶液（PBS）
√匀浆培养基（HM）
10%（w/v）牛血清白蛋白（BSA）
Percoll 储存液
10%（w/v）Nonidet-40（NP-40）的水溶液
滚珠挤压式细胞匀浆器（更多细节详见 Balch 及 Rothman，1985）
低速离心机，配有水平型转头及 10ml 离心管
Sorvall 高速离心机，配有 SE-12 及 SS-34 固定角度型转头或同类产品
Beckman 超速离心机，配有 50Ti、70Ti、T865（Sorvall）固定角度型转头或同类产品
梯度取样器：纤细的金属套管与一个蠕动泵相连

1. 用 5ml 磷酸缓冲盐溶液（PBS）洗 1×10^8～3×10^8 个 HL-60 细胞 1 次，再用 5ml HM 洗 1 次，以 500g 的速度离心 10min 以沉淀细胞，再以 3ml HM 悬浮细胞。

2. 将沉淀置于滚珠挤压式匀浆器中，经 5 次操作以获得匀浆。用 0.5ml HM 清洗匀浆器并将清洗液加入匀浆中。
3. 用低速离心机以 800*g* 的速度离心 10min 以沉淀细胞核、细胞碎片及未破裂的细胞，倒出或吸出上清置于冰上。
4. 用 1ml HM 重新悬浮细胞核沉淀（轻度涡旋振荡），重复步骤 3。
5. 将上清液混合，加入 HM 至终体积 3.5ml（如果需要）。将 3ml 上清液与 0.18ml 10%牛血清白蛋白（BSA），1.0ml Percoll 储存液（终浓度 20%）及 HM 混合，混合液终体积为 4.5ml。用 Beckman 50Ti 转头或类似的固定角度型转头，0～4℃ 36 000*g*超速离心 30min。
6. 使用梯度取样器收集梯度液（每个组分 0.4ml），密度末端为先。

   含溶酶体的带接近梯度的底端
7. 先向每一个梯度组分中加 10%的 Nonidet-40（NP-40）（终浓度达 0.5%），再在 Percoll 溶液中沉淀：0～4℃，100 000*g* 超速离心 1～2h。如果实验目的是要获得完整的细胞器，就不能这样做。
8. 分离制备完成后尽快对溶酶体（见支持方案 1 及 2）、过氯化物酶体（单元 3.7）、线粒体（单元 3.6）或内质网（单元 3.7）进行代谢功能的检测。

支持方案 1　酸性磷酸酶的测定

酸性磷酸酶是溶酶体的标志酶。由于非特异性的酸性磷酸酶普遍存在，所以糖苷酶被愈来愈多地用作标志酶，如 β-半乳糖苷酶（如 Graham，1997；单元 3.6）或 β-*N*-乙酰葡萄糖胺酶（如 Berg et al.，1985；支持方案 2）。

材料（带√项见附录 1）

√测定缓冲液 I

√底物溶液 I

梯度组分（见基本方案 1 或 2）

0.25mol/L NaOH

1. 将等体积的测定缓冲液 I 和底物溶液 I 混合，制备成测定溶液。在含 0.2ml 测定溶液的微量离心管中，加入 50μl 每种梯度组分，此实验要做双份。
2. 在加入 50μl 梯度组分前，为每种组分准备一份对照，其中含 0.2ml 测定溶液及 0.6ml 0.25mol/L NaOH。将测定管置于 37℃孵育 30min。
3. 向每份检测样品中加 0.6ml 0.25mol/L NaOH 溶液以终止反应。以最大速度微量离心 1～2min 来清除沉淀。
4. 用塑料比色杯，在 410nm 处测定实验组相对于对照组的吸光值。

   硝基苯酚的摩尔吸光系数为 9620/cm/(mol/L)。

支持方案 2　β-*N*-乙酰葡糖胺酶的测定

这种敏感的荧光测定法的基本原理是：4-甲基伞形酮基 *N*-乙酰-β-葡糖胺在酸性 pH 条件下释放 4-甲基伞形酮，随后在 pH 10.0 或 11.0 的条件下测定这种糖苷配基的荧光。

材料（带√项见附录 1）

√测定缓冲液Ⅱ
√底物缓冲液Ⅱ
√碳酸氢盐缓冲液
1.2mmol/L（21mg/100ml）4-甲基伞形酮，新鲜制备
荧光计及合适的比色杯

1. 测定缓冲液Ⅱ及底物缓冲液 II 各取 0.5ml 与 0.45ml 水混合。加入 50μl 样品。
2. 重复步骤 1 为每份组分准备一对照管，并加入 3ml 碳酸氢盐缓冲液，再加入 50μl 样品，在 37℃孵育 30～60min。
3. 用水稀释 1.2 mmol/L 的 4-甲基伞形酮，制备成 1.2～12 nmol 的 1ml 标准液，每管中加 0.5ml 反应缓冲液Ⅱ，由此绘出标准曲线。
4. 在所有样品及标准反应管（不是空白对照）中加入 3ml 碳酸盐缓冲液，于波长 488nm 测定荧光强度，以 360nm 作为激发波长。

   如果必须澄清样品，就在每个管中加入 1.5ml 3.3%（w/v）TCA，放置 5min，用微量离心机离心 2min，去除沉淀，在 2ml 上清液中加入 2ml 碳酸盐缓冲液，测定荧光。

参考文献：Graham，1997
撰稿人：John M，Graham

单元 3.5　差速离心法从组织和细胞中分离线粒体

本单元中的方案是从三种不同的哺乳动物组织（肝脏、心脏、骨骼肌）培养的细胞及酵母中，分离线粒体组分的简单、快速的方法。

注意：蛋白酶抑制剂（见配方）可加入某种或所有培养基中，由研究者自行决定。

注意：所有使用活体动物的方案都必须预先进行审核并得到动物使用及保护委员会（IACUC）的批准，必须执行政府有关实验室动物保护及使用的规定。

注意：所有溶液、玻璃器皿、离心管及设备都应在 0～4℃预冷，并始终保持在冰上。手持 Potter-Elvehjem 匀浆器的玻璃管时要戴一个隔热手套或使用硅树脂橡胶手保护器，这不仅仅是为了避免来自皮肤的热传递，也是为了在出现玻璃管断裂这种意外事故时可以保护手。

基本方案1　用大鼠肝脏制备重线粒体组分

材料（带√项见附录1）

150～200g 雄性 Sprague-Dawley 大鼠
√肝脏匀浆培养基（LHM），冰浴

解剖工具
Potter-Elvehjem 匀浆器（0.09mm 间隙；25ml 工作体积）
高架的高扭矩电动马达（半导体闸流管控制）
低速离心机，配有水平型转头以及合适的离心管
高速离心机，配有固定角度型转头以及 40～50ml 聚碳酸酯离心管
真空泵
Dounce 匀浆器（30～40ml 体积），配有松弛型研磨棒（Wheaton B 型）

1. 150～200g 雄性 Sprague-Dawley 大鼠禁食过夜，拉颈或去头处死。
2. 打开腹腔，取出肝脏，置于预冷的含 20ml LHM 的烧杯中，吸去培养基，用剪刀将肝脏剪切成小于 $25mm^3$ 的小块。
3. 将细小的组织块置于 30ml 冰冷 LHM 中，搅动组织块，使组织块沉降，吸去培养基，再加入 40ml 新鲜培养基。
4. 将一半的悬液转移至 Potter-Elvehjem 匀浆器预冷的玻璃管中，将预冷的研磨棒与高架的高扭矩电动马达相连，研磨棒上下磨动 5 或 6 次，对小块肝组织进行匀浆，转速为 500r/min。将匀浆物放入一烧杯中置于冰上。
5. 用培养基淋洗匀浆器，擦拭研磨棒，去除所有黏附的结缔组织，再将另一半悬液同样操作一遍。
6. 用配有水平型转头的低速离心机，将匀浆物于 4℃，1000*g* 离心 10min，吸取上清转移至 40～50ml 的聚碳酸酯离心管中。
7. 用配有固定角度型转头的高速离心机将上清于 4℃，3000*g* 离心 10min。用一根玻璃巴氏吸管连接在真空泵上，吸去每个管中的上清，尽可能地将吸管的尖端放在弯月状液面处以尽量去除漂浮的脂层。同时也尽量去除位于棕色线粒体层上面的一层比较松散的略带粉红色的物质。用纸巾擦去管壁上吸附的脂质。
8. 在每管沉淀物中加入少量 LHM（约 8ml），用一根玻棒将沉淀物粗略搅开，然后用 Dounce 匀浆器轻缓地磨动 3 或 4 次，使沉淀物完全散开。加入 LHM 达到最初的体积，转移到一个新的离心管中，用高速离心机以 3000*g* 离心 10min。
9. 重复步骤 7 和 8 两次以上。
10. 用缓冲液重悬纯化的线粒体（见表 3.5.1），缓冲液的成分应当与后继的分析工作或步骤相协调，在许多情况下使用 LHM 是令人满意的。

表 3.5.1 大鼠肝脏主要细胞器的大小（d）和 d^2

微粒	大小/μm	d^2
核	4～12	16～144
质膜薄片[a]	3～20	9～400
高尔基膜	1～2	1～4
线粒体	0.4～2.5	0.16～6.25
溶酶体	0.4～0.8	0.16～0.64
过氧化物体	0.4～0.8	0.16～0.64
大多数小泡	0.05～0.3	0.0025～0.09

a. 只有像肝脏这样器官化的组织才能在一定匀浆条件下产生质膜薄片。

基本方案 2 牛心脏线粒体的大量制备

材料（带√项见附录 1）

牛心脏，新鲜分离，500～600g
√心脏清洗缓冲液
2.0mol/L Tris 基液
√蔗糖/琥珀酸酯溶液（SS）
总体积 2～3L 的商品碎肉机
韦林氏搅切器或其他大容量旋转刀片匀浆器
棉布
低速离心机，配有水平型转头及 250～750ml 的瓶子
高速离心机，配有固定角度型转头
玻璃棒
Dounce 匀浆器（50ml 体积），配有松弛型研磨棒（Wheaton B 型）

1. 将新鲜分离的牛心脏切成小块（$4mm^3$），用一个商品碎肉机绞一下，悬浮于 800ml 冰冷的心脏清洗缓冲液中。在搅拌过程中，用 2.0mol/L 的 Tris 基液将悬液的 pH 调至 7.8。
2. 将液体倒在两层棉布上，然后挤压，尽量去除液体，将切碎的组织转移至一个干净的烧杯中，悬浮于 800ml 冰冷的 SS 中。
3. 将一半的悬液转移至韦林氏搅切器中，高速匀浆 20s，用 2.0mol/L 的 Tris 基液再将 pH 调至 7.8，然后再搅 60s。将另一半悬液也同样操作一遍，合并两次的匀浆物，以冰冷的 SS 稀释至 2.2L。
4. 将匀浆物转移至 250～750ml 的离心瓶中，在配有水平型转头的低速离心机中，4℃，800g 离心 20min。小心倒出上清，用配有固定角度型转头的高速离心机再次离心，4℃，26 000g 离心 20min，丢弃上清。
5. 倾斜瓶子，在每瓶的沉淀物上轻轻倒入约 10ml SS，轻轻悬浮起上面的浅棕色层，即遭到部分破坏的线粒体，去除这些物质。加入约 20ml SS，用一根玻棒将留下的深

棕色线粒体层粗略地搅开，避开管底几乎是黑色的、坚硬的沉淀物。

6. 用 Dounce 匀浆器轻缓地磨动 2 或 3 次，使线粒体完全悬浮。用约 300ml SS 稀释这些悬液，于 4℃，26 000*g* 离心 20min，收集及重新悬浮沉淀物的中间一层（如步骤 5）。
7. 如果 SS 培养基的组分不适合于后继的分析研究，将悬液于 4℃，26 000*g* 离心 20min，用合适的培养基重悬沉淀物。

基本方案 3　用骨骼肌制备线粒体

材料（带√项见附录 1）

150～200g 的雄性 Sprague-Dawley 大鼠
√肌肉清洗缓冲液
√肌肉匀浆培养基Ⅰ
√肌肉匀浆培养基Ⅱ
解剖工具
Potter-Elvehjem 匀浆器（约 0.3mm 间隙；40ml 工作体积）
高架的高扭矩电动马达（半导体闸流管控制）
细小的尼龙网（孔径是 200μm）
低速离心机，配有水平型转头及合适的离心管
高速离心机，配有固定角度型转头
Dounce 匀浆器（30ml 体积），配有松弛型研磨棒（Wheaton B 型）

1. 150～200g 的雄性 Sprague-Dawley 大鼠，拉颈或去头处死。
2. 迅速解剖出 4～5g 腿部横纹肌，用 50ml 肌肉清洗缓冲液洗两次。
3. 在冰冷的表面将肌肉切成小于 $30mm^3$ 的细小块（例如，将一个玻璃盘放在碎冰上，用两把解剖刀来切）。
4. 往组织中加入 40ml 肌肉匀浆培养基Ⅰ，0～4℃孵育 5min。
5. 转移至 Potter-Elvehjem 匀浆器预冷的玻璃管中，将预冷的研磨棒与高架的高扭矩电动马达相连，研磨棒上下磨动 8 次，转速为 700r/min。将匀浆物于 0～4℃搅拌孵育 5min。
6. 用等体积的肌肉匀浆培养基Ⅱ稀释匀浆物，再次匀浆，如步骤 5。
7. 将匀浆物用细小的尼龙网过滤，滤液用配有水平型转头的低速离心机于 4℃，2000*g* 离心 10min。倒出上清保存于冰上。
8. 加入 20ml 肌肉匀浆培养基Ⅱ，将沉淀物再次匀浆，研磨棒上下磨动 3 次，再次离心，将上清与第 1 次得到的上清合并。
9. 用配有固定角度型转头的高速离心机离心得到线粒体，4℃，10 000*g* 离心 10min。加入 20ml 肌肉匀浆培养基Ⅱ重新悬浮清洗沉淀，用 Dounce 匀浆器轻缓地磨动 2 或 3 次。
10. 再次离心，如步骤 9。用一种培养基重悬沉淀，它的成分要与后继分析研究相适应，在许多情况下使用肌肉匀浆培养基Ⅱ或 LHM（见配方）是相当令人满意的。

基本方案 4　用培养的细胞制备线粒体

材料（带√项见附录 1）

汇合的单层培养细胞（总量 2×10^8 个）
√PBS，室温
√细胞匀浆培养基（CHM）
含有 1mol/L 蔗糖的 CHM（见配方）
√蔗糖/Mg^{2+} 培养基
√线粒体悬浮培养基Ⅰ
刮匙
Potter-Elvehjem 匀浆器（约 0.09mm 间隙；10～15ml 工作体积）
高架的高扭矩电动马达（半导体闸流管控制）
低速离心机，配有水平型转头及相配套的离心管
高速离心机，配有固定角度型转头及相配套的离心管
Dounce 匀浆器（5～10ml 体积），配有松弛型研磨棒（Wheaton B 型）

1. 室温条件下清洗单层培养物 2 次，每次用 60ml PBS。用刮匙刮下细胞，收集于 60～80ml PBS 中，室温，1000g 离心 15min 得到细胞沉淀。
2. 吸去或倒掉所有上清，用冰冷的细胞匀浆培养基重悬细胞，培养基的体积是沉淀物体积的 6 倍，在冰上放置 2min。
3. 将预冷的研磨棒与高架的高扭矩电动马达相连，研磨棒上下磨动 5 次进行细胞匀浆，转速为 500r/min。在相差显微镜下检查，确认≥90%的细胞已经破损。
4. 加入 1/3 体积的冰冷的含有 1mol/L 蔗糖（终浓度 0.25mol/L）的 CHM，反复颠倒轻轻混匀。
5. 用配有水平型转头的低速离心机，于 4℃，1000g 离心 5min，使细胞核沉淀。倒出或吸出上清，用配有固定角度型转头的高速离心机，于 4℃，5000g 离心 10min。
6. 以 10ml 冰冷的蔗糖/Mg^{2+} 培养基重悬沉淀物，用 Dounce 匀浆器轻缓地磨动 2 或 3 次。再次离心，4℃，5000g 离心 10min。用 2～3ml 冰冷的线粒体悬浮培养基Ⅰ或其他与后继程序相匹配的培养基重悬沉淀。

基本方案 5　用酵母菌（酿酒酵母）制备线粒体

材料（带√项见附录 1）

处于对数生长早期至中期的酵母培养物，生长于 YPD 培养基（1%酵母提取物/2%细菌蛋白胨/2%葡萄糖；见单元 1.6）
√DTT 缓冲液
√酵母山梨醇缓冲液
消解酶-100T［来自分节孢子杆菌（Arthrobacter luteus），100 000U/g，如 ICN

Biomedicals，Sigma]
√原生质体匀浆培养基，冰浴
√线粒体悬浮培养基Ⅱ，冰浴
低速离心机，配有水平型转头及相配套的离心管
高速离心机，配有固定角度型转头及相配套的离心管
30℃培养箱
Dounce 匀浆器（5～10ml 体积），配有松弛型研磨棒（Wheaton B 型）

1. 通过离心培养物（约 1L）收集对数生长早期至中期的酵母菌（OD_{600} 约 0.6，约 10^7 个细胞），用配有水平型转头的低速离心机离心，室温，1000*g* 离心 10min。用一个预先称重的离心管离心，倒掉上清后再称一下重量，以此计算出酵母的湿重。
2. 用 3～4 倍体积的蒸馏水洗一遍细胞，再次离心，用 2 倍体积的 DTT 缓冲液重悬，30℃孵育 30min，再次离心。
3. 用 3～4 倍体积的酵母山梨醇缓冲液洗一遍细胞，然后用这种培养基重悬细胞，0.15g 湿重/ml。
4. 按照 0.25mg/100g 湿重的比例加入消解酶-100T 搅拌，30℃孵育约 1h。4℃，1000*g* 离心 10min，收集原生质体。用 3～4 倍体积的酵母山梨醇缓冲液洗一遍沉淀物。
5. 用 2 倍体积的冰浴的原生质体匀浆培养基重悬原生质体，所有后继的操作都应在 0～4℃进行，用 Dounce 匀浆器上下磨动，不要超过 10 次。
6. 用等量的原生质体匀浆培养基稀释匀浆物，4℃，1000*g* 离心 10min，通过离心去除细胞核以及没有破碎的原生质体。倒出或吸取上清，用配有固定角度型转头的高速离心机离心，4℃，6500*g* 离心 10min。
7. 用 40ml 冰浴的线粒体悬浮培养基Ⅱ洗一遍沉淀物，再次离心，以 10ml 同样的缓冲液重悬。

参考文献：Evans，1992；Graham，1997；Rice and Lindsay，1997
撰稿人：John M. Graham

单元 3.6　密度梯度离心法纯化粗线粒体组分

对线粒体代谢作用的研究常常用差速离心法制备的细胞器来进行（单元 3.5），而不用比较费时的梯度离心法。但有时为了获得高产量的相对纯的线粒体，或者为了确定线粒体的一种特殊成分或功能的定位的特异性（与其他细胞器相比较），密度梯度离心法就成为从其他膜微粒中分离得到理想线粒体溶液的最好策略（表 3.6.1）。

注意：在所有方案中，*g* 的数值都是 g_{av}，

注意：所有的溶液、玻璃器皿、离心管及设备都必须在 0～4℃预冷，并始终保持在冰上。

注意：本方案中使用的培养基中的添加物（见配方）可选择，可加入任何或所有溶液中。

表 3.6.1 哺乳动物肝脏的主要细胞器在 Iodixanol、蔗糖、Percoll 中的密度（单位：g/ml）

微粒	在 Iodixanol 中的密度	在蔗糖中的密度	在 Percoll 中的密度
细胞核	1.23～1.25	>1.32	NA[a]
过氧化物体	1.18～1.21	1.19～1.23	1.075～1.085
线粒体	1.14～1.16	1.17～1.21	1.085～1.100
溶酶体	1.11～1.13	1.19～1.21	1.105～1.111
高尔基体	1.03～1.08	1.05～1.12	1.03～1.105

a. 不可利用。

基本方案 1 用连续蔗糖梯度液分离大鼠肝脏的线粒体组分

虽然本方案是为分离大鼠肝脏的线粒体组分而设计，但修改后也能用于其他哺乳动物组织及酵母菌的线粒体组分分离。

材料（带√项见附录 1）

√常规使用的匀浆培养基（GHM），冰浴
√蔗糖梯度溶液
√蔗糖垫层
√蛋白酶抑制物（可选用）
Dounce 匀浆器（5～10ml 体积，配有 Wheaton B 型松弛型研磨棒）
低速离心机，配有水平型转头及相配套的离心管
高速离心机，配有固定角度型转头及相配套的离心管
梯度制备仪（双室或 Gradient Master）
超速离心机（如有垂直转头的 Backman Vti 50）及 39ml 离心管
梯度取样器（可选用）

1. 按照单元 3.5（基本方案 1）所描述的方法制备大鼠肝的匀浆物，但用冰浴的 GHM 代替 LHM。
2. 用配有水平型转头的低速离心机离心得到细胞核的沉淀物，4℃，1000g 离心 5min。如果需要，将细胞核清洗一次以最大限度地保留线粒体。
3. 将去掉细胞核后的上清用配有固定角度型转头的高速离心机离心，4℃，15 000g 离心 10min，得到线粒体沉淀物。以 8ml 预冷的 GHM 重悬线粒体沉淀，再用 Dounce 匀浆器轻缓磨动 3 或 4 次。
4. 于 Backman Vti 50 超速离心机的 39ml 离心管中，用两室的梯度混合仪制备 28ml 线性蔗糖梯度溶液，蔗糖梯度为 34%～64%（w/v），在每个离心管的底部铺上 4ml 蔗糖垫层。
5. 在梯度溶液的上面加入 7～8ml 样品，4℃，170 000g 离心 65min。用一个梯度取样器收集梯度溶液，每份 1～2ml，采集浅棕色的线粒体条带，其位置在离心管中间的上方（连续梯度）。

6. 用≥2倍体积的冰冷的GHM稀释样品，4℃，20 000g 离心 20min。以冰冷的GHM或其他适宜的培养基重新悬浮沉淀物，使其浓度为1～5mg/ml。

基本方案2　用非连续PERCOLL梯度液从大鼠脑分离线粒体

分离大鼠脑细胞线粒体的方法极少，仅用差速离心法这一纯化步骤，这可能是由于有突触体和髓磷脂的污染。

注意： 所有使用活体动物的方案都必须预先进行审核并得到动物使用及保护委员会（IACUC）的批准，必须执行政府有关实验室动物保护及使用的规定。

注意： 所有的溶液、玻璃器皿、离心管及设备都必须在0～4℃预冷，并始终保持在冰上。

材料（带√项见附录1）

150～200g 的 Sprague-Dawley 大鼠
√脑匀浆培养基（BHM），冰浴
√含 Percoll 的 BHM：15%（v/v），23%（v/v），40%（v/v）
√蛋白酶抑制物（可选用）
10 ml 的 Dounce 匀浆器，配有紧密型和松弛型研磨棒（分别是 Wheaton A 型和 B 型）
低速离心机，配有水平型转头及相配套的离心管
高速离心机，配有固定角度型转头及相配套的离心管
超速离心机，配有水平型转头和 12ml 的离心管

1. 150～200g Sprague-Dawley 大鼠禁食过夜，去头处死。
2. 解剖出脑组织，约500mg，置于冰冷的BHM，用这种培养基洗3次。用剪刀将这些组织切成细小的块，加5ml的BHM悬浮这些组织块，用配有松弛型研磨棒的10ml的Dounce匀浆器上下磨动5次，然后再用紧密型研磨棒上下磨动10次。
3. 用配有水平型转头的低速离心机，4℃，1300g 离心 3min，倒出并保留上清。以BHM重悬沉淀物至起始体积，用紧密型研磨棒磨动10次，再次匀浆。
4. 再次离心，倒出上清，与第一次（步骤3）得到的上清合并。用配有固定角度型转头的高速离心机离心，4℃，21 000g 离心 10min，丢弃上清。用5ml 15%的Percoll溶液重新悬浮沉淀物。
5. 在一个与水平型转头相匹配的适宜离心管中，加入含Percoll的BHM：23%和40%的各加4ml，在其上面加入3ml的线粒体悬液，4℃，31 000g 离心 5min。
6. 收集线粒体，位于最低界面的那条带。用4倍体积的冰冷的BHM稀释样品，用固定角度型的转头离心，4℃，17 000g 离心 10min，去上清，重新悬浮线粒体沉淀，适宜浓度为1～5mg/ml。

基本方案3　用自发形成梯度的PERCOLL梯度液分离线粒体组分

材料（带√项见附录1）

√甘露醇缓冲液A，冰冷
√30%（v/v）Percoll溶液，冰冷
√蛋白酶抑制物（可选用）
低速离心机，配有水平型转头及相配套的离心管（30ml）
5ml和30ml的Dounce匀浆器，配有松弛型研磨棒（Wheaton B型）
高速离心机，配有固定角度型转头及相配套的离心管（30ml）
超速离心机，配有固定角度型转头（如Backman 60Ti或Sorvall T-1250）及适宜的离心管

1. 制备大鼠肝的匀浆物，如单元3.5所描述（基本方案1），但要用冰冷的甘露醇缓冲液A代替LHM。
2. 用配有水平型转头的低速离心机离心匀浆物，4℃，1000*g*离心10min，吸出上清液放入新的离心管中，放在旁边。用20ml冰浴的甘露醇缓冲液A重新悬浮沉淀物，用30ml Dounce匀浆器轻缓磨动2或3次，1000*g*离心30min，吸出上清，与第一次离心的上清合并。
3. 用配有固定角度型转头的高速离心机离心上清液，4℃，10 000*g*离心15min。弃上清，用20ml冰冷的甘露醇缓冲液A重悬沉淀（如步骤2），4℃，10 000*g*离心15min，弃上清。
4. 用5ml冰冷的甘露醇缓冲液A重悬浅色的线粒体沉淀，在5ml Dounce匀浆器中轻缓磨动2或3次。
5. 在4个与固定角度型转头（如Backman 60Ti或Sorvall T-1250）相配的离心管中各加上20ml 30%的Percoll溶液，将重悬的线粒体加在上面。4℃，95 000*g*离心30min，在低于1000r/min的减速过程中，关闭刹车或用可控的减速程序（在超速离心机中如果可用）。
6. 收集梯度溶液，每份1～2ml。
   在密集的棕/黄色条带的较低部分含有大量纯化的线粒体。
7. 用≥2倍体积的冰冷的甘露醇缓冲液A稀释梯度组分，用配有固定角度型转头的高速离心机离心沉淀细胞器，4℃，6300*g*离心10min。
8. 用10ml这种缓冲液清洗线粒体沉淀至少2次，再用适宜的培养基重悬至蛋白质浓度达1～5mg/ml。

支持方案1　线粒体的琥珀酸脱氢酶分析

尽管三羧酸循环中的任何一种组分都可作为线粒体功能研究的标志物，但最常用的标志物是琥珀酸脱氢酶与其固有的电荷受体（细胞色素*c*）或人造受体*p*-碘硝基四唑紫

(INT)。

材料（带√项见附录1）

线粒体梯度组分（见基本方案1～4）

√琥珀酸盐溶液

√INT溶液

√终止溶液Ⅰ

分光光度计和玻璃管

1. 取0.3ml琥珀酸盐溶液放入1.5～2.0ml的小离心管中，包括一系列为每个组分作空白对照的小管，采用双管分析。

   对于许多梯度组分，设立单个用缓冲液代替样品的空白对照就足够了。也可设立一个在步骤3加入INT之前加入终止液的空白对照。

2. 每个梯度组分取10～20μl加入各样品管中，将样品和空白对照置于37℃孵育10min。
3. 加入0.1ml INT溶液，37℃再孵育10～20min，加入1ml终止溶液Ⅰ结束反应，以最大速度微量离心2min，去掉所有沉淀。
4. 用玻璃比色杯，相对于适宜的空白对照测定吸光值（波长490nm）。
5. 计算酶的活性，即每毫克蛋白质还原的INT微摩尔数。

   还原的INT的分子消光系数是19 300/cm/(mol/L)。

支持方案2　溶酶体的β-半乳糖苷酶分析

β-半乳糖苷酶是可用于检测溶酶体的几种糖苷酶之一。

材料（带√项见附录1）

线粒体梯度组分（见基本方案1～4）

√底物溶液

√终止溶液Ⅱ

分光光度计和塑料比色杯

1. 每个梯度组分取20～40μl（约含30μl蛋白质），加入含0.5ml底物溶液的各个小离心管中，采用双管分析。在加入梯度组分之前每个组分制备一个空白对照：加入1ml终止液Ⅱ。

   对于许多梯度组分，设立单个用缓冲液代替样品的空白对照可能就足够了。

2. 将样品在37℃孵育30min，加入1ml终止液Ⅱ以测定样品，以最大速度微量离心1～2min，去掉所有沉淀。
3. 用塑料比色杯，相对于所选择的空白对照测定样品的吸光值（波长410nm）。

   邻硝基苯酚的分子消光系数是9600/cm/(mol/L)。

支持方案 3　过氧化物体的过氧化氢酶分析

注意：取氧代硫化钛时要小心操作，因为这种试剂有很强的腐蚀性。

注意：所有操作应在冰上于 2ml 小离心管中进行。

材料（带√项见附录 1）

线粒体梯度组分（见基本方案 1～4）
√过氧化物储存液
√Tris/BSA 溶液
√氧代硫化钛试剂
√样品缓冲液
分光光度计

1. 制备底物混合液：取 8.5ml 过氧化物储存液，用 Tris/BSA 溶液稀释至 100ml，保存于 0℃。
2. 取 1ml 氧代硫化钛试剂加至 0.5ml 底物混合液中，于波长 450nm 测定吸光值，应该是 1.5。
3. 取 10μl 梯度组分与 30μl 样品缓冲液混合，同时用 40μl 样品缓冲液设立试剂空白对照，采用双管分析。
4. 在所有小管中加入 0.5ml 底物混合液，操作时一批 6 个管，每隔 10s 在一个管中加入这种分析混合液。
5. 准确计时 1min 后，加入 1ml 氧代硫化钛试剂（也是每 10s 加一个）。
6. 4℃，以最大速度微量离心 2min，去掉所有沉淀。
7. 将小管转移至室温，以含有 0.5ml Tris/BSA 溶液和 1ml 氧代硫化钛试剂的管做空白对照，于波长 450nm 测定吸光值。
8. 计算酶的活性，即试剂对照吸光值减去各个梯度组分的测试吸光值。

参考文献：Dobrota and Hinton，1992；Graham，1993；Sims，1990

撰稿人：John M. Graham

单元 3.7　用差速离心法和密度梯度离心法从组织和细胞中分离过氧化物体

几乎毫无例外的是，从哺乳动物组织匀浆物纯化过氧化物体需要经过两个阶段：①差速离心得到轻的线粒体组分；②用某种密度梯度溶液分离这种轻的线粒体组分（表 3.7.1）。在收集梯度溶液中的带状物质之后，通过各种标志酶（表 3.7.2）来分析常规检测组分分离是否成功。

表 3.7.1 在不同梯度介质中轻线粒体组分中细胞器的密度

细胞器	密度/(g/ml)			
	蔗糖	Nycodenz	Iodixanol	Percoll
内质网	1.06～1.23	1.05～1.16	1.03～1.13	1.03～1.06
高尔基体膜	1.05～1.12	1.03～1.08	1.03～1.06	1.03～1.05
溶酶体	1.19～1.21	1.12～1.15	1.11～1.14	1.06～1.12
线粒体	1.17～1.21	1.13～1.16	1.13～1.15	1.05～1.08
过氧化物体	1.18～1.23	1.17～1.20	1.16～1.19	1.04～1.06

表 3.7.2 大鼠肝细胞差速离心组分中蛋白质和酶分布状况[a,b]

组分	百分比(相对的特异性活性)				
	蛋白质	过氧化物酶	SDH	NADPH cyt *c* red	AP
Nuc	30～50	20～25(<1.0)	50～60(<2.0)	20～25(<1.5)	20～25(<2.0)
H Mit	15～25	7.5～12.5(<0.5)	20～25(>3.0)	5～7.5(<0.2)	10～12.5(<1.0)
L Mit	7.5～12.5	20～25(>3.0)	5～10(<2.0)	5～10(<1.0)	20～25(>3.0)
Mic	12.5～17.5	1～2(<0.2)	10～15(<0.5)	50～55(>3.0)	2～5(<0.2)
Cytosol	25～30	25～30(<1.0)	0	5～10(<0.5)	20～25(<1.5)

a. 表中数据是每个组分中蛋白质和酶的百分比，括号中的数据是酶的相对特异性活性(酶的百分比/蛋白质的百分比)。

b. 缩写：AP，酸性磷酸酶；H Mit，重线粒体的；L Mit，轻线粒体的；Mic，微粒体；NADPH cyt *c* red，NADPH 细胞色素 c 还原酶；Nuc，核；SDH，琥珀酸脱氢酶。

注意： 所有使用活体动物的方案都必须预先进行审核并得到动物使用及保护委员会(IACUC)的批准，必须执行政府有关实验室动物保护及使用的规定。

注意： 所有溶液、玻璃器皿、离心管及设备都应在 0～4℃ 预冷，始终保持在冰上。离心机转头应在同样的温度预冷。手持 Potter-Elvehjem 匀浆器的玻璃管时要戴一个隔热手套或使用硅树脂橡胶手保护器，这不仅仅是为了避免来自皮肤的热转移，也是为了在出现玻璃管断裂这种意外事故时可以保护手。

基本方案 1 从大鼠肝脏分离轻线粒体组分

材料（带√项见附录 1）

150～200g 的 Sprague-Dawley 大鼠

√匀浆培养基（HM）

√蛋白酶抑制剂（可选用），按配方中说明的浓度加至某个或所有培养基中

解剖工具

用于匀浆器的高架高扭矩电动马达（半导体闸流管控制）

Potter-Elvehjem 匀浆器（约 0.09mm 间隙），25ml 工作体积，预冷

Dounce 匀浆器（Wheaton B 型松弛型研磨棒，30ml），预冷

Dounce 匀浆器（Wheaton B 型松弛型研磨棒，5ml），预冷
冷冻低速离心机，配有水平型转头和 50ml 离心管
40～50ml 聚碳酸酯离心管
冷冻高速离心机，配有固定角度型转头和 50ml 离心管（如 Sorvall SS-34）

1. 动物禁食过夜，拉颈或去头处死。
2. 打开腹腔，取出肝脏，置于预冷的含 20ml HM 的烧杯中，吸去培养基，用剪刀将肝脏剪切成小于 25mm³ 的小块。
3. 用 40ml HM 悬浮细小的组织块，将一半的悬液转移至 Potter-Elvehjem 匀浆器的玻璃管中，将预冷的研磨棒与高架的高扭矩电动马达相连，研磨棒上下磨动 5 或 6 次，对小块肝组织进行匀浆，转速为 500r/min。
4. 将匀浆物放入一个烧杯置于冰上。用培养基淋洗匀浆器，擦拭槌棒，去除所有黏附的结缔组织。重复步骤 3，将另一半悬液再操作一遍，合并匀浆物。
5. 用低速离心机将匀浆物于 0～4℃，750*g* 离心 10min，吸取及保留上清。
6. 以 20ml HM 重悬沉淀物，先用玻璃棒搅，再用 30ml Dounce 匀浆器轻缓地磨动 3 或 4 次，使沉淀物完全散开。离心，吸取及保留上清（步骤 5）。
7. 将步骤 5 和 6 得到的上清合并，转移至 40～50ml 的聚碳酸酯离心管中，用高速离心机将上清于 0～4℃，3500*g* 离心 10min，吸取及保留上清。
8. 将步骤 7 离心（3500*g*）得到的上清用高速离心机离心，0～4℃，23 000*g* 离心 20min，吸去上清。
9. 以 20ml HM 重新悬浮轻线粒体沉淀（LMP），用玻璃棒搅，然后用 30ml Dounce 匀浆器轻缓地磨动 3 或 4 次，0～4℃，23 000*g* 再次离心 20min，弃上清。
10. 以 6ml HM 重新悬浮 LMP，用玻璃棒搅，然后用 5ml Dounce 匀浆器轻缓地磨动 3 或 4 次（分两批操作），利用这些悬液进行所有后继的密度梯度离心，从大鼠肝脏分离过氧化物体。

基本方案 2　用预先形成的连续 IODIXANOL 梯度液分离大鼠肝脏轻线粒体组分中的过氧化物体

材料（带√项见附录 1）

√Iodixanol 梯度溶液 A、B、C
轻线粒体沉淀（LHP）悬浮液（见基本方案 1）
√匀浆培养基（HM）
√蛋白酶抑制剂（可选用），按配方中说明的浓度加至某个或所有培养基中。
梯度制备仪：双室或 Gradient Master（Accurate Chemical）
5ml 注射器，带金属套管（内径 1mm）
超速离心机，以及与固定角度型转头（如 Beckman 60Ti 或 Sorvall T-865）相配的薄壁聚碳酸酯离心管（30ml）

梯度取样器（纤细的金属套管与一个蠕动泵相连），用于密度末端为先（dence-end-first）的收集方式

1. 在与超速离心机的转头相配的薄壁聚碳酸酯离心管中，用双室梯度制备仪（或 Gradient Master）制备两个线性梯度溶液，Iodixanol 梯度溶液 B 和 C 各取 9ml。用一个注射器和金属管在每个梯度溶液的下层加 2ml 的 Iodixanol 梯度溶液 A。
2. 取 3ml 的 LMP 悬液加在每个梯度溶液上，0～4℃，105 000g 超速离心 1h。

   如果离心机具有一个慢加速设备，就使用这样一个操作程序：用超过 4min 的时间使转头的速度从 0 升至 2000r/min。
3. 自 2000r/min 开始的减速过程中，不使用刹车（或用可控的减速程序）。用一个梯度取样器来吸取收集梯度组分，密度末端为先，每 1ml 一份。

   过氧化物体在 Iodixanol 中的中位密度是 p＝1.17g/ml，峰值组分位于底部往上 7～8ml 的位置。
4. 用 2 倍以上体积的 HM 稀释组分，0～4℃，30 000g 离心 20min。
5. 用 1～2ml HM 或其他适宜的培养基重悬沉淀物，取一整数量样品进行蛋白质分析（附录 3B），然后调整体积使浓度达到 1～5mg/ml。

基本方案 3 用预先形成的连续 NYCODENZ 梯度液分离大鼠肝脏轻线粒体组分中的过氧化物体

材料（带√项见附录 1）

√含 20%（w/v）Nycodenz 的匀浆培养基（HM）
√含 50%和 60%（w/v）Nycodenz 的高密度稀释液（HD）
轻线粒体沉淀（LHP）悬浮液（见基本方案 1）
√匀浆培养基（HM）
√蛋白酶抑制剂（可选用），按配方中说明的浓度加至某个或所有培养基中
梯度制备仪：双室或 Gradient Master（Accurate Chemical）
带金属套管（内径 1mm）的 5ml 注射器
超速离心机，配有直角型转头（如 Beckman VTi50 或 Sorvall 50V39）以及相配套的离心管（39ml）
梯度取样器，用于密度末端为先的收集方式（试管穿孔设备或与真空泵相连的细金属管）

1. 在与超速离心机的直角型转头相配的离心管中，用双室梯度制备仪（或 Gradient Master）制备线性梯度溶液，20%和 50% Nycodenz 溶液各取 17ml。
2. 用一个注射器和金属管在梯度溶液的下层加 2ml 的 60% Nycodenz 溶液作为密度垫。
3. 取 2～3ml 的 LMP 悬液加在梯度溶液的上面，0～4℃，60 000g 超速离心 75min，操作时使用一个在加速和减速过程中可以保证梯度溶液在离心管中平稳再定位的程序。
4. 用一个梯度取样器来收集梯度组分，密度末端为先，每份 1～2ml。

过氧化物体的条带靠近梯度溶液的底部。

5. 用2倍以上体积的HM稀释组分，0～4℃，30 000g离心20min。用1～2ml HM或其他适宜的培养基重悬沉淀物，取一整数量样品进行蛋白质分析（附录3B），然后调整体积使蛋白质浓度达到1～5mg/ml。

基本方案4　用预先形成的连续NYCODENZ梯度液从酵母原生质体分离过氧化物体

虽然野生型酵母的过氧化物体含量很少，但它们可以被诱导增殖；有许多过氧化物体基因缺失的品种。

材料（带√项见附录1）

√酵母匀浆培养基（HYM）

含15% Nycodenz的酵母低密度稀释液（YLD；见配方）

含42.5%和50%（w/v）Nycodenz的酵母高密度稀释液（YHD；见配方）

√酵母低密度稀释液（YLD）

√酵母高密度稀释液（YHD）

√蛋白酶抑制剂（可选用），按配方中说明的浓度加至某个或所有培养基中

Dounce匀浆器（Wheaton B型，40ml）

Dounce匀浆器（Wheaton B型，5～10ml）

梯度制备仪：双室或Gradient Master（Accurate Chemical）

带金属套管（内径1mm）的5ml注射器

超速离心机，配有直角型转头（如Beckman VTi65.1或Sorvall 65V13）及相配套的离心管（13ml）

梯度取样器，用于密度末端为先的收集方式（试管穿孔设备或与真空泵相连的细金属管）

冷冻高速离心机，配有固定角度型转头及相配套的50ml离心管（如Sorvall SS-34）

1. 用1L的酵母培养液制备原生质体，以YPD培养基培养至OD_{600}达0.5～1.0（单元3.5）。
2. 用35ml酵母匀浆培养基（YHM）悬浮原生质体，用40ml Dounce匀浆器匀浆，研磨棒上下磨动10次，匀浆物于0～4℃，1500g离心10min。吸取及保留上清于冰上。
3. 以35ml YHM重悬沉淀，按步骤2再次离心。
4. 合并两次得到的上清液，0～4℃，25 000g离心30min，以6ml YHM重悬轻线粒体沉淀，用小体积的Dounce匀浆器匀浆，研磨棒轻缓磨动10次。
5. 在与超速离心机直角型转头相配的离心管中，用双室梯度制备仪（或Gradient Master）取等体积的15%和42.5% Nycodenz溶液，制备10.5ml线性梯度溶液。用一

个注射器和金属管在梯度溶液的下层加 0.5ml 的 50% Nycodenz 溶液作为密度垫。

6. 将酵母轻线粒体沉淀物（步骤 4）加在梯度溶液的上面，加满离心管，0～4℃，174 000g 超速离心 75min。操作时使用一个在加速和减速过程中可以保证梯度溶液在离心管中平稳再定位的程序，如果没有适宜的控制程序，就在速度低于 2000r/min 时关掉刹车。
7. 用一个梯度取样器来收集梯度组分，密度末端为先，每份 0.5ml。用 2 倍以上体积的 YHM 稀释组分，0～4℃，30 000g 离心 20min。用 1～2ml YHM 或其他适宜的培养基重悬沉淀物，取一整数量样品进行蛋白质分析（附录 3B），然后调整体积使蛋白质浓度达到 1～5mg/ml。

基本方案 5　用预先形成的连续 NYCODENZ 梯度液从培养细胞（HepG2）分离过氧化物体

材料（带√项见附录 1）

细胞悬液（约 10^8 个细胞），用 3～5ml 匀浆培养基（HM；见配方）悬浮
√匀浆培养基（HM）
含 10%（w/v）Nycodenz 的匀浆培养基（HM，见配方）
含 40% 和 50%（w/v）Nycodenz 的高密度稀释液（HD；见配方）
√蛋白酶抑制剂（可选用），按配方中说明的浓度加至某个或所有培养基中
滚珠挤压式匀浆器（见 Balch and Rothman，1985，有详细解释）
低速离心机，配有 10～20ml 离心管的水平型转头
Dounce 匀浆器（5～10ml，Wheaton B 型）
高速离心机，配有 10～14ml 离心管的固定角度型转头（如 Sorvall SE12）
梯度制备仪：双室或 Gradient Master（Accurate Chemical）
带金属套管（内径 1mm）的 5ml 注射器
超速离心机，配有直角型转头（如 Beckman VTi65.1 或 Sorvall 65V13）及相配套的离心管（约 13ml）
梯度取样器，用于密度末端为先的收集方式（试管穿孔设备或与真空泵相连的细金属管）

1. 细胞匀浆：在滚珠挤压式匀浆器中，来回推 5 次，相差显微镜下检查，细胞破损率≥90%。
2. 用低速离心机将匀浆物于 0～4℃，500g 离心 5min，吸取上清保存于冰上。
3. 以 HM 重悬沉淀，用 Dounce 匀浆器的研磨棒磨动 4 或 5 次，重复步骤 2 和 3。
4. 合并的上清液用高速离心机离心，0～4℃，6000g 离心 10min。吸取上清于 0～4℃，20 000g 再次离心 15min。
5. 吸去上清，以 3～4ml HM 重悬轻线粒体沉淀，用 Dounce 匀浆器的研磨棒轻缓磨动 3 或 4 次。

6. 取等体积的10％和40％ Nycodenz溶液，用双室梯度制备仪（或Gradient Master），在与直角型转头相配的离心管中制备10ml线性梯度溶液。用一个注射器和金属管在梯度溶液的下层加0.5ml的50％ Nycodenz溶液作为密度垫。
7. 取2ml步骤5得到的沉淀悬液加在梯度溶液的上面，加满离心管，0～4℃，75 000g超速离心25～35min。操作时使用一个在加速和减速过程中可以保证梯度溶液在离心管中平稳再定位的程序，如果没有适宜的控制程序，就在速度低于2000r/min时关掉刹车。
8. 用一个梯度取样器来收集梯度组分，密度末端为先，每份0.75ml。用≥2倍体积的HM稀释组分，0～4℃，30 000g离心20min。用1～2ml HM或其他适宜的培养基重悬沉淀物，取一整数量样品进行蛋白质分析（附录3B），然后调整体积使蛋白质浓度达到1～5mg/ml。

支持方案　内质网标志酶NADPH细胞色素*c*还原酶的分析

NADPH细胞色素c还原酶是一种重要的氧化还原酶，它与存在于内质网的生物合成途径的氧化状况有关。

材料（带√项见附录1）

√分析缓冲液
25mg/ml细胞色素*c*溶于分析缓冲液（新鲜配制，保存于冰上）
10mmol/L EDTA（1ml 100mmol/L EDTA储存液用水稀释至10ml）
1mg/ml鱼藤酮溶于乙醇（4℃储存1个月以上）
2mg/ml NADPH溶于分析缓冲液（新鲜配制，保存于冰上，避光）
带1ml比色杯的记录式分光光度计（可见光波长）

1. 将分析缓冲液置于室温，所有操作都在此室温下进行。
2. 调节图表记录仪，显示每0.2吸光值为一个完整的比例单位偏差。
3. 在1ml比色杯中加入50μl细胞色素*c*、10μl的10mmol/L EDTA、10μl的1mg/ml鱼藤酮、1ml的分析缓冲液，再加入50μl的样品，混匀。
4. 当基线稳定时，记录波长550nm处的吸收光值，然后加入0.1ml的NADPH，充分混匀，继续监测吸收光值，直到该值在1～2min内呈线性增加为止。
5. 测定斜率以计算酶活性（还原的细胞色素*c*的微摩尔数/min）。
   还原的细胞色素*c*摩尔吸光系数为27 000。

参考文献：Dobrotoa and Hinton，1992；Evans，1992；Ghosh and Hajra，1986；Graham，1993

撰稿人：John M. Graham

单元 3.8　从哺乳动物组织中分离细胞核及核膜

绝大多数分离细胞核和核膜的方法是采用哺乳动物体内柔软的组织（如大鼠肝脏）作为生物材料；但是，在本单元中所描述的方案普遍适用于任何类型的组织，培养的细胞或是低等真核生物或植物的细胞，只要能采用匀浆化方法的组织、细胞都可以用。

注意： 所有使用活体动物的方案都必须预先进行审核并得到动物使用及保护委员会（IACUC）的批准，必须遵守政府有关实验室动物保护及使用的规定。

注意： 所有的溶液、玻璃器械、离心管及仪器必须在 0～4℃条件下预冷，并且要始终置于冰上。离心转头也必须预冷至相同温度。

注意： 蛋白酶抑制剂（见配方）可添加至某个或所有溶液中。

基本方案 1　使用蔗糖密度筛从大鼠肝组织匀浆中分离细胞核

材料（带√项见附录 1）

150～200g Sprague - Dawley 大鼠
√细胞核分离培养基（NIM）
√蔗糖密度筛（SDB）
剪刀或刀片
约 30ml 的 Potter - Elvehjem 匀浆器，约有 0.1mm 间隙，松弛型研磨棒
孔径为 75μm 的尼龙网或粗棉布（纱制品）
玻璃棒
低温低速离心机，配有水平型转头及配套的 50ml 聚丙烯或聚苯乙烯离心管
30ml Donnce 匀浆器，配有松弛型 Wheaton B 型研磨棒
折射率计
超速离心机，配有水平型转头（如 Beckman SW40Ti 或 Sorvall TH641）及配套的 14ml 离心管

1. 一只 150～200g Sprague - Dawley 大鼠禁食过夜。拉颈或断头处死。
2. 开腹腔取出其肝脏，置于盛有约 20ml 胞核分离液（NIM）的冷烧杯中。将烧杯中液体吸出，并使用剪刀或刀片将肝脏切成小于 $25mm^3$ 的碎块。
3. 用 40ml NIM 悬浮上述碎块，并将一半悬液移入约 30ml Potter - Elvehjem 匀浆器的玻璃容器内。将研磨棒与电动机相连，以 500r/min 的转速上下研磨 4 或 5 次，研磨肝脏碎块。
4. 将匀浆物倒入放在冰上的烧杯中。用 NIM 清洗匀浆器，随后再清洗研磨棒去除可能黏附的结缔组织，重复这一过程（即步骤 3，4），处理另一半小块悬液。
5. 使用单层的尼龙网（孔径 75μm）或 3 层粗棉布（纱制品）过滤匀浆物，以除去未破裂的细胞及结缔组织。如果必要的话，可以用玻璃棒搅拌以辅助过滤。
6. 至少用等体积的 NIM 来稀释匀浆。

对于在低渗液中被匀浆的培养的细胞，可向其中加入等体积的含 0.5mol/L 蔗糖的缓冲液。

如果匀浆中既不含 KCl 也不含 $MgCl_2$，就在添加的缓冲液中将这些盐的浓度增加一倍。

7. 将悬液平均分配至两个 50ml 离心管中，用配有水平型转头的低速离心机，4℃，800g 离心 10min。吸出上清液，尽量将上层松软的棕色薄层洗去。用 30ml Dounce 匀浆器将沉淀重新悬浮于 40ml NIM 中，再次离心。
8. 吸出上清液，并用 NIM 将沉淀合并制成粗悬浮液，可使用玻璃棒搅拌，该悬液终体积约为 8ml。向重悬的细胞核沉淀中加入 2 倍体积的蔗糖密度筛（SDB）并用 Dounce 匀浆器彻底地混匀。
9. 使用折射率计测定该悬液的折射率应为 1.4117±0.0004。如果需要，用 SDB 调整浓度达到该折射率值。
10. 将 9ml 悬液加入 14ml 的超速离心管中。在下层加入 2.3mol/L 蔗糖溶液以填补管中剩余体积。用水平型转头在 4℃，100 000g 超速离心 1h。
11. 用刮刀刮去弯液面上飘浮的任何物质，吸出沉淀以上所有液体。将离心管倒转过来晾干数分钟，尽量排干黏稠的蔗糖层。当离心管倒转过来的时候，用一把裹着软纸的镊子尽量擦去管壁上的液体。
12. 用 NIM 重新悬浮上述沉淀，或用其他与后续步骤相容的培养基悬浮，浓度达到约 5mg/ml。

备择方案　使用 IODIXANOL 梯度液从动物或植物（麦芽）细胞中分离细胞核

使用 iodixanol 梯度液分离细胞核，是利用细胞核在等渗的非离子环境下有等密度带。由于细胞核能保持它们的正常水合状态，它们的密度（ρ=1.20～1.22g/ml）远低于蔗糖的密度（>1.32g/ml）。

附加材料（同见基本方案 1；带√项见附录 1）

过滤后的匀浆物（动物细胞或组织；见基本方案 1）或麦芽
√50%（w/v）iodixanol（动物细胞或组织）
√30%和 35%（w/v）iodixanol 梯度液（动物细胞或组织）
√25%和 40%（w/v）iodixanol 梯度液（麦芽）
麦芽培养基（WGM）
高速离心机，配有水平型转头及配套的 50ml 离心管

针对动物细胞或组织

1a. 如前所述制备过滤后的匀浆物（见基本方案 1，步骤 1～5）。
2a. 将匀浆物与等体积的 50% iodixanol 混合。

3a. 在 50ml 离心管中依次铺上 15ml 35% iodixanol 梯度液、15ml 30% iodixanol 梯度液及样品。
4a. 用配有水平型转头的高速离心机，在 4℃条件下，以 10 000*g* 的速度离心 20min。
5a. 在 35% iodixanol 梯度液的上层收集细胞核并用两倍体积的 NIM 加以稀释。

针对麦芽

1b. 将约 5g 的麦芽置于约 50ml WGM 中，剧烈摇动以制备细胞核粗悬液。
2b. 沉降细胞碎片约 10min，小心地吸出上清液。
3b. 依次预先铺好 5ml 25% iodixanol 梯度液和 5ml 40% iodixanol 梯度液，在其上铺 20 ml细胞核粗悬液。
4b. 用配有水平型转头的高速离心机，在 4℃条件下，以 5600*g* 的速度离心 30min。
5b. 收集细胞核，其带位于 40% iodixanol 梯度液之上。
6b. 用配有水平型转头的低速离心机，在 4℃条件下，以 2000*g* 的速度离心 10 min。用 NIM（动物细胞或组织）或 WGM（麦芽），或其他与后续步骤相配的培养基重新悬浮沉淀物，浓度约 5mg/ml。

基本方案 2　分离细胞核膜：高离子强度的方法

材料（带√项见附录 1）

√200mmol/L PMSF
√细胞核悬浮培养基（NSM）
DNase I
RNase
√孵育缓冲液（IB）
√高浓度 NaCl 缓冲液（HNB）
2-巯基乙醇
√细胞核膜储存培养基
20ml Dounce 匀浆器，配有松弛型 Wheacon B 型研磨棒
制冷的低速离心机，配有水平型转头

1. 制备细胞核（见基本方案 1 或备择方案），在所有培养基中加入 1mmol/L PMSF（用 200mmol/L 储存液稀释）
2. 用细胞核悬浮培养基（NSM）悬浮细胞核，使其浓度达 5～8mg/ml（见支持方案 1 和 3），并用 20ml Dounce 匀浆器轻缓搅 3 或 4 次。向其中加入 DNase I 及 RNase 至终浓度 250mg/ml，并在 4℃缓慢搅拌 1h。
3. 在配有水平型转头的低速离心机中，4℃，1000*g* 离心 10min 以沉降细胞核。用相同体积的孵育缓冲液（IB）重新悬浮沉淀至 DNA 终浓度 5～8mg/ml。
4. 在 4℃搅拌，同时逐滴加入 4 倍体积的高浓度 NaCl 缓冲液（HNB）。向其中加入 2-巯基乙醇至终浓度 1%（v/v），再搅拌 15min，然后在配有水平型转头的低速离心

机中，4℃，1600g 离心 30min 以沉淀细胞核被膜。用 IB 重悬浮沉淀，并重复该步骤，但无需加 2-巯基乙醇。

5. 在配有水平型转头的低速离心机中，4℃，1600g 离心 30min 以获取核膜。如果不急于分析核膜（表 3.8.1），就以细胞核储存培养基（NMSM）悬浮核膜并保存于 −20℃。

表 3.8.1 核膜中酶的组成[a]

	葡萄糖-6-磷酸酶活性（μmol 磷酸/h /mg/蛋白质）	NADHCR[b] 活性（μmol 还原的细胞色素 c/h/mg/蛋白质）	DNA 聚合酶活性（pmol 结合的 TMP/min/mg/蛋白质）
细胞核	1.32	6.48	68.3
核膜	9.6	16.0	9.0
微粒体	10.56	45.5	无

a. 在授权下数据源于 Kay 等(1972)。

b. NADHCR＝NADH 细胞色素 c 还原酶。

基本方案 3 分离细胞核膜：低离子强度的方法

应用这种方法产生的片段其范围从不完整的“云雾状”产物到核孔的极小片段，这样可以保留住核纤层及核孔，有助于细胞组成的研究。

材料（带√项见附录 1）

√200mmol/L PMSF

√低离子浓度悬浮培养基（LISM）

1.0mg/ml DNase Ⅰ

√蔗糖缓冲液，pH 为 7.4 和 8.5（SB7.4 及 SB8.5）

√NMSM

10ml Dounce 匀浆器，配有松弛型 Wheaton B 型研磨棒

高速离心机，配有固定角度型转头及 15ml 离心管

1. 制备细胞核（见基本方案 1 或备择方案），在所有培养基中添加 1mmol/L PMSF（用 200mmol/L PMSF 储存液稀释）。
2. 用低离子强度悬浮培养基（LISM）悬浮细胞核，浓度达 3～4mg/ml（见支持方案 1 和 3），并使用 10ml Dounce 匀浆器轻缓地搅拌 4 或 5 次。添加 DNase Ⅰ 储存液（1mg/ml）至终浓度 5μg/ml，并加入 4 倍体积蔗糖缓冲液，其 pH 为 8.5（SB8.5）。在 22℃下轻缓地搅动，孵育约 15min，向其中加入等体积的冰冷蒸馏水。
3. 将上述溶液移至适宜的离心管中，用配有固定角度型转头的高速离心机，在 4℃条件下，以 38 000g 的速度离心 15min。用相同体积的蔗糖缓冲液重新悬浮沉淀，其 pH 为 7.4（SB 为 7.4），向该体系中加 DNase Ⅰ 至终浓度 1μg/ml。于 22℃轻缓地搅动

约 15min，然后加入等体积的冰冷蒸馏水。

4. 4℃，38 000g 离心 15min。若不能立即对膜进行分析，就用细胞核储存培养基（NMSM）重新悬浮核膜并保存于－20℃。

支持方案 1　二苯胺检测 DNA

材料（带√项见附录 1）

500μg/ml DNA 标准溶液
5%，10%及 20%（w/v）三氯乙酸（TCA），冰冷的
样品
√二苯胺试剂

1. 先将 20%（w/v）TCA 储存液稀释至 5%（w/v），再用此液将 500μg/ml DNA 标准溶液稀释成 0～200μg/ml 的一系列 DNA 溶液。
2. 可选用步骤：对于溶于蔗糖溶液的样品，可加入同等体积冰冷的 20%（w/v）TCA 以沉淀 DNA。
3. 置于冰上 10min 后，用配有水平型转头的低速离心机，在 4℃条件下，以 1000g 的速度离心 20min，以沉淀 DNA。
4. 用冰冷的 10%TCA 洗 DNA 沉淀两次。
5. 将标准溶液、膜悬浮液或溶于 5%（w/v）TCA（1ml 终体积）中的沉淀进行 DNA 水解，90℃，20min。
6. 用微量离心机以最大速度离心 2min。
7. 在每份 0.5ml 上清液中（包括含 0.5ml 5%TCA 的空白对照）加入二苯胺试剂，100℃加热 10min。冷却至室温，于波长 595nm 测定吸光度。

支持方案 2　苔黑素测定 RNA

材料（带√项见附录 1）

500μg/ml DNA 及 RNA 标准溶液
5%，10%及 20%（w/v）TCA
样品
√苔黑素试剂

1. 用水稀释 500μg/ml DNA 及 RNA 标准液至每 0.5ml 含 0～200mg 核酸。
2. 可选择步骤：对于溶于蔗糖溶液的样品，可加入等体积的冰冷的 20%TCA 以沉淀核酸。
3. 在置于冰上 10min 后，用配有水平型转头的低速离心机，在 4℃条件下，以 1000g 的速度离心 20min，以沉淀核酸。
4. 用冰冷的 10%TCA 洗 DNA 沉淀两次。

5. 用 0.5ml 水重新悬浮沉淀。
6. 向 0.5ml 标准液、膜悬浮液或重新悬浮的沉淀中，加 0.1ml 水及 0.2ml 20%(w/v)TCA。
7. 90℃水解核酸 20min。
8. 用微量离心机以最大速度离心 2min。
9. 向所有的 0.6ml 上清液及含 0.6ml 5%TCA 的空白对照中，加入 0.6ml 苔黑素试剂，100℃加热 20min。冷却至室温并在 660nm 处测定吸光度。从总吸光度值中减去双脱氧核糖的值就是分离组分中 RNA 含量的精确值。用二苯胺法测定组分中 DNA 的量(见支持方案 1)，并用苔黑素 DNA 标准曲线将上述结果转换成 A_{660} 的值。从样品的 A_{660} 值减去此值。

支持方案 3　溴化乙锭测定 RNA 及 DNA

警告： 溴化乙锭是诱变剂，它的使用、保存及丢弃要格外地小心。

注意： 在本方案中，使用含 Ca^{2+} 及 Mg^{2+} 的磷酸缓冲盐溶液（PBSCM）配制溶液和稀释液。

材料（带√项见附录 1）

√含 Ca^{2+} 及 Mg^{2+} 的磷酸缓冲盐溶液（PBSCM）
25μg/ml DNA 标准溶液：于－20℃可保存 2～3 个月
25μg/ml 肝素
样品
50μg/ml RNase：100℃加热 10min 使 DNase 变性
25μg/ml 溴化乙锭
3ml 比色杯
发射波长为 580nm、激发波长为 360nm 的分光荧光光度计

1. 临用前，用 4 倍体积的 PBSCM 稀释 25μg/ml DNA 标准液。
2. 向标注 a～f 序号的 3ml 比色杯中，加入以下混合物：
   a. 标准液：0.5ml 5μg/ml DNA 标准液、0.5ml 肝素溶液及 1.0ml PBSCM
   b. 空白对照 I：0.5ml 肝素溶液及 1.5ml PBSCM
   c. 空白对照 II：2.5ml PBSCM
   d. 样品（DNA＋RNA）：0.5ml 样品、0.5ml 肝素溶液及 1.0ml PBSCM
   e. 样品（DNA）：0.5ml 样品、0.5ml 肝素溶液、0.5ml 50μg/ml RNase 及 0.5ml PBSCM
   f. 样品空白对照：0.5ml 样品及 2.0ml PBSCM
   如果需要，就用 PBSCM 稀释样品，以使 DNA 达到能被测定出来的水平。
3. 将所有比色杯在 37℃孵育 20min。
4. 除 c 与 f 外，向其余比色杯中加 0.5ml 25μg/ml 溴化乙锭。

5. 先将混合物搅匀，再在 580nm 波长的发射光及 360nm 波长的激发光下测其荧光强度。标准液（a）的荧光强度设定在 100，在测定过程中温度应保持恒定（±0.5℃）。测定的时间至少应在加入溴化乙锭 1min 以后，但 1h 以内。测定 RNase 溶液的荧光强度，如果需要则减去该值。
6. 使用下列公式计算样品中的 DNA 量：

$$A_{DNA}=\frac{A_{std}\ (F_e-F_b-F_f+F_c)}{F_a-F_b}$$

使用下列公式计算 RNA 的量：

$$A_{RNA}=\frac{A_{std}\ (F_d-F_e)}{0.46\times\ (F_a-F_b)}$$

式中，A_{DNA}是样品混合物中 DNA 的量；A_{RNA}是样品混合物中 RNA 的量；A_{std}是标准品混合物中 DNA 的量；F 是荧光强度。

参考文献：Birnie，1978；Rickwood et al.，1997

撰稿人：John M. Graham

单元 3.9　酿酒酵母的亚细胞组分分离

经改进的针对出芽酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）的亚细胞组分分离技术，能为研究复杂的细胞功能的分子机制提供一条有效探索途径。许多其他酿酒酵母的亚细胞组分分离方案及相应的参考文献列于表 3.9.1 中。

表 3.9.1　针对酿酒酵母的亚细胞组分分离方案

关注点	首选技术	可借鉴的参考文献[a]
内吞和分泌的途径		
	蔗糖速率梯度	Antebi and Fink,1992. *MBC* 3:633;
		Schimmoller et al.,1995. *EMBOJ*. 14:1329;
		Schroder et al.,1995. *JCB* 131:895
	蔗糖平衡梯度[b]	Bowser and Novick,1991. *JCB* 112:1117;
		Becherer et al.,1996. *MBC* 7:579
	蔗糖平衡梯度,ConA 处理	Chuang and Schekman,1996. *JCB* 135:597;
		Ziman et al.,1996. *MBC* 7:1909;
		Ziman et al.,1998. *MBC* 9:1565
	Nycodenz 平衡梯度[b]	Rieder and Emr,1997. *MBC* 8:2307
	Nycodenz 平衡漂浮梯度	Singer and Riezman,1990. *JCB* 110:1911
	蔗糖/D_2O 分级梯度	Singer-Kruger et al.,1993. *JBC* 268:14376
	蔗糖 2 级梯度[b]	Dean and Pelham,1990. *JCB*111:369;
		Gaynor et al.,1994. *JCB* 127:653
细胞器的分离		
细胞核	蔗糖分级梯度	Strambio-de-Castillia et al.,1995. *JCB*131:19
	蔗糖分级梯度[b]	Aris and Blobel,1991. *Methods Enzymol*. 194:735;
		Dove et al.,1998. *Methods Cell Biol*. 53:33;

续表

关注点	首选技术	可借鉴的参考文献[a]
		Mann and Mecke,1980. *BBA* 687:57
	Ficoll/甘油梯度	Kalinich and Douglas 1989. *JBC* 264:17979;
		Chang et al.,1999. *Methods Enzymol*. 304:76
核被膜	PVP-蔗糖分级梯度	Strambio-de-Castillia et al.,1995. *JCB* 131:19
	Ficoll-蔗糖梯度	Mann and Mecke,1982. *BBA* 687:57;
		Hurt et al. , 1988. *Eur. JCB* 46:554
内质网	蔗糖 2 级梯度[b]	Wuestehube and Schekman,1992. *Methods Enzymol*. 219:124
	蔗糖多级梯度	Zinser et al.,1991. *J. Bacteriol*. 173:2026
	连续蔗糖梯度(RER 及 SER)	Sanderson and Meyer,1991. *JBC* 266:13423
高尔基体	山梨醇梯度	Cleves et al., 1991. *Cell* 64:789;
		McGee et al.,1994. *J. Bacteriol*. 176:6861
	蔗糖/D_2O 分级梯度	Lupashin et al., 1996. *JCB* 132:277
囊泡	低渗裂解,双 Ficoll 分级梯度[b]	Uchida et al., 1988. *Methods Enzymol*. 157:544;
		Roberts et al., 1991. *Methods Enzymol*. 194:644
	等渗裂解,Ficoll 分级梯度[b]	Haas,1995. *Methods Cell Sci*. 17:283;
		Mayer et al., 1996. *Cell* 85:83
囊泡内颗粒	Iodixanol 梯度(Optiprep)	Harding et al.,1995. *JCB* 131:591;
		Oda et al., 1996. *JBC* 132:999
线粒体	自成的 Percoll 梯度	Yaffe,1991. *Methods Enzymol*. 194:627
	Nycodenz 分级梯度[b]	Glick and Pon,1995. *Methods Enzymol*. 260:213
	蔗糖梯度	Daum et al.,1982. *JBC* 257:13028;
		Zinser et al.,1991. J. *Bacteriol*. 173:2026;
		Poyton et al.,1995. *Methods Enzymol*. 260:97;
		Martin et al.,1998. *Anal . Biochem*. 265:123
线粒体膜	蔗糖分级梯度(内膜)	Jascur,1991. *Methods Cell Biol*. 34:359
	连续蔗糖梯度(外膜及接触点)	Pon et al.,1989. *JCB* 109:2604;
		Simbeni et al.,1991. *JBC* 266:10047
	蔗糖分级梯度(外膜)	Alconada et al.,1995. *Methods Enzymol*. 260:263
过氧化物酶体	Nycodenz/蔗糖梯度	Thieringer and Kunau,1991. *JBC* 266:13110;
		Kunau et al.,1993. *Biochimie* 75:209;
		Erdmann and Blobel,1995. *JCB* 128:509
	蔗糖分级梯度[b]	McCammon et al.,1990. J. *Bacteriol*. 172:5816;
		Distel et al.,1996. *Methods Mol. Biol*. 53:133
	Nycodenz 梯度	Lewin et al.,1990. *MCB* 10:1399
质膜	玻璃珠裂解法,蔗糖分级梯度[b]	Serrano,1988. *Methods Enzymol*. 157:533;
		Panaretou and Piper,1996. *Methods Mol. Biol*. 53:117
	原生质体阳离子珠(Cation bead)	Schmidt et al.,1983. *BBA* 732:421;
	分离法	Panaretou and Piper,1996. *Methods Mol. Biol*. 53:117
后高尔基体分泌膜囊[c]	葡聚糖 S-1000	Walworth and Novick,1987. *JCB* 105:163
	葡聚糖 S-1000,电泳	Holcomb et al.,1987. *Anal. Biochem* 166:328
	葡聚糖 S-1000, Nycodenz 梯度	Harsay and Bretscher,1995. *JCB* 131:297
内质网至高尔基体	可渗透的细胞,亲和分离	Groesch et al.,1990. *JCB* 111:45;
的囊泡		Groesch et al.,1992. *Methods Enzymol*. 219:137

续表

关注点	首选技术	可借鉴的参考文献[a]
	纯化的膜及 COPⅡ组分	Barlowe et al.,1994. *Cell* 77:895;
		Yeung et al.,1995. *JBC* 270:30567
	可渗透的 ypt1[ts]细胞[c],亲和分离	Rexach et al.,1994. *JCB* 126:1133
网格蛋白包被小泡	葡聚糖 S-1000 交换柱	Mueller and Branton,1984. *JCB* 98:341
细胞裂解液/细胞溶胶	全细胞的玻璃珠裂解法[b]	Wuestehube and Schekman,1992. *Methods Enzymol*. 219:124;
		Haas,1995. *Methods Cell Sci*. 17:283
	原生质体的渗透压裂解法	Cheng et al., 1990. *Methods Enzymol*. 181:89;
		Hartley et al.,1996 *Methods Mol. Biol*. 53:249;
		Schultz,1999. *Methods* 17:161
	全细胞的液氮冷冻裂解法	Dunn and Wobbe,1993. *CPMB* 单元 13.13

a. 简称:*BBA*,Biochimica Biophysica Acta;*CPMB*,Current Protocols in Molecular Biology;*Eur JCB*,European Journal of Cell Biology;*JBC*,Journal of Biological Chemistry;*JCB*,Journal of Cell Biology;*MBC*,Molecular Biology of the Cell;*MCB*,Molecular Cell Biology.

b. 本单元中均包括这些方案。

c. 囊泡是从某些温度敏感突变酵母菌株中分离得到的,这些酵母可以在非承受的条件下积累囊泡。

为了进行亚细胞组分分离,细胞壁较厚的酵母菌必须经过裂解(表 3.9.2)。可以通过一些标志蛋白质(表 3.9.3)、标志酶(表 3.9.4)及组分特异性的翻译后修饰物(表 3.9.5)来鉴定亚细胞组分。鉴定所需的关键性参数见表 3.9.6,上述方案中疑难问题解答见表 3.9.7。

表 3.9.2 酵母细胞裂解技术:优点和缺点

方法	优点	缺点
玻璃珠裂解法	快速有效的匀浆化	会造成细胞器和细胞器膜的较大损坏
	可用于许多小型培养物(使用涡旋混合器)或大型培养物(使用小珠搅拌器)	搅动会产生热量(加速蛋白质裂解)和气泡(导致蛋白质变性)
	玻璃珠价格低廉制作简单	会破坏蛋白质和膜间相互的作用
	在裂解细胞前不需要孵育步骤	其裂解效率的可重复性低于原生质体裂解法
	质膜不会过多时间地暴露于水解酶环境中	
原生质体的制备和裂解	当原生质体处于渗透压的和/或机械的作用力时,细胞器和蛋白复合物的损伤最小	比玻璃珠裂解法持续时间长
	原生质体裂解法效率高、可重复性强	裂解细胞前的额外孵育时间(30~60min)会与一些实验目的和步骤相冲突
	裂解原生质体有多个方案:	原生质体易破碎;渗透性的支持和温和地摇晃有助于预防未成熟的裂解
	DEAE-易化的等渗裂解法(最为普遍的方法),暴露于低渗条件下(渗透性休克),Dounce 匀浆,以及或多次通过注射器针头或移液器吸头	用于消化细胞壁所制备的酶会造成质膜蛋白的损伤
	裂解和匀浆化程度很容易调整(例如,在使用 Dounce 匀浆器时改变搅动的次数或研磨棒的间隙)	高纯度葡聚糖苷酶的制备(如酶解酶 100T)相对昂贵
	可使用高质量葡聚糖苷酶制备物(如酶解酶 100T)	虽然裂解酶比酶解酶便宜,但是它的制备过程需要时间和精力
	如果在实验室制备,裂解酶是很便宜的	

表 3.9.3 鉴定分离的亚细胞组分所使用的标记蛋白

亚细胞分离物	标记分子(及相应基因)[a,b]	可借鉴的参考文献[c]
质膜		
	Gas1p(*GAS1*)	Nuoffer et al., 1991. *MCB* 11:27
	H^+-ATPase(*PMA1*)	Goffeau and Dufour, 1998, *Methods Enzymol*. 157:528;
		Serrano, 1998. *Methods Enzymol*. 157:533
	突触融合蛋白复合物(*SSO1*, *SSO2*)	Aalto et al., 1993. *EMBO J*. 12:4095
	几丁质合成酶(*CHS1*, *CHS2*, *CHS3*);	Chuang and Schekman, 1996. *JCB* 135:597;
	以及与壳糖体/胞内体相关的几丁质合成酶	Ziman et al., 1996. *MBC* 7:1909;
		Ziman et al., 1998 *MBC* 9:1565
	α1-3-葡聚糖合成酶(*GLS1*, *GLS2*)	Mazur et al., 1995. *MCB* 15:5671
	PM 受体和转运蛋白	Andre, 1995. *Yeast* 11:1575;
		van der Rest et al., 1995. *Microbiol. Rev*. 59:304
	a-因子受体(*STE3*, α 系);顺式的	Davis et al., 1993. *JCB* 127:53
	α-因子受体(*STE2*, a 系);顺式的	Blumer et dl., 1988. *JBC* 263:10836
胞内体		
膜	Pep12p(*PEP12*)	Becherer et al., 1996. *MBC* 7:579
	a-因子受体(*STE3*, α 系);顺式的	Davis et al., 1993. *JCB* 127:53;
		Wendland and Emr, 1998, *JCB* 141:71
	α-因子受体(*STE2*, a 系);顺式的	Blumer et al., 1988. *JBC* 263:10836;
		Wendland and Emr, 1998., *JCB* 141:71
管腔	内源性[^{35}S]α-因子(*MFα1*); 顺式的	Singer and Riezman, 1990. *JCB* 110:1911;
		Dulic et al., 1991. *Methods Enzymol*. 194:697;
		Wendland and Emr, 1998. *JCB* 141:71
高尔基体		
膜,顺面	α1-6-甘露糖基转移酶(*OCH1*);	Nakayama et al., 1992. *EMBO J*. 11:2511;
	ER 中也存在	Gaynor et al., 1994. *JCB* 127:653
膜,中间	鸟苷二磷酸酶(*GDA1*)	Vowels and Payne, 1998. *MBC* 9:1351
	α1-3-甘露糖基转移酶(*MNN1*)	Cunningham and Wicker, 1989. *Yeast* 5:25
	α1-2-甘露糖基转移酶(*KRE1*)	Lussier et al., 1995. *JCB* 131:913
膜,反面[d]	内源性蛋白酶 *ysc*F(*KEX2*)	Redding et al., 1991. *JCB* 113:527;
		Cooper and Bussey, 1992. *JCB* 119:1459
	羧基肽酶 *ysc-α*(*KEX1*)	Bryant and Boyd, 1993. *J Cell Sci* 106:815
	二肽氨基肽酶 A(*STE13*)	Bryant and Boyd, 1993. *J Cell Sci* 106:815;
		Nothwehr et al., 1993. *JCB* 121:1197
	囊泡蛋白受体(*VPS10*)	Marcusson et al., 1994. *Cell* 77:579;
		Cereghino et al., 1995. *MBC* 6:1089
过氧化物酶体		
膜	ABC 转运复合物(如 *PXA1*, *PXA2*)	Hettema et al., 1996. *EMBO J*. 15:3813;
		Shani and Valle, 1998. *Methods Enzymol*. 292:753
	Peroxins(如 *PEX3*, *PEX13*)	Hohfeld et al., 1991. *JCB* 114:1167;
		Gould et al., 1996. *JCB* 135:86;
		Waterham and Cregg, 1997. *Bioassays* 19:57

续表

亚细胞分离物	标记分子(及相应基因)[a,b]	可借鉴的参考文献[c]
基质	过氧化物酶体酶：例如，乙酰 CoA 氧化酶(*POX1*)，苹果酸脱氢酶(*MDH3*)，过氧化氢酶 A(*CTA1*)，3-酮酰基 CoA 硫解酶(*POT1*)，烯酰 CoA 水合酶(*EDH1*,*EDH2*)，3-羟基乙酰 CoA 差相异构酶(*FOX2*)，柠檬酸合酶(*CIT2*)	Dmochowska et al. ,1990. *Gene* 88:247; Kispal and Srere, 1991. *Arch. Biochem. Biophys.* 286:132; Kunau and Hartig, 1992. *Antonie van Leuwenhook* 62:63; Singh et al. ,1992. *MCB* 12:5593; Kunau et al. ,1993. *Biochimie* 75:209; Subramani,1993. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 9:445; Erdmann and Kunau,1994. *Yeast* 10:1173; McAlister-Henn et al. ,1995. *JBC* 270:21220; Geisbrecht et al. ,1998. *JBC* 273:33184; Gurvitz et al. ,1998. *JBC* 273:31366
线粒体		
外膜	膜孔蛋白(*POR1*,*POR2*)[c]	De Pinto et al. , 1987. *BBA* 894:109
	外膜易位酶(如 *TOM72*, *TOM20*, *TOM40*,*TOM7*)	Lithgow et al. ,1995. *Trends Biochem. Sci.* 20:98; Pfanner et al. ,1997. *Annu. Rev. Cell Devel. Biol.* 13:25; Pfanner and Meijer,1997. *Curr. Biol.* 7:R100; Kunkele et al. ,1998. *Cell* 93:1009
	OM45p(*OM45*)	Yaffe et al. ,1989. *JBC* 264:21091
内膜	细胞色素氧化酶(如 *COX1*, *COX2*, *COX3*,*COX4*)[f]	Taanman and Capaldi, 1995. *Eur. J. Biochem.* 227:22481; Geier et al. ,1997. *FEBS Lett.* 412:296
	琥珀酸脱氢酶(如 *SDH3*,*SDH4*)	Daignan—Fornier et al. ,1994. *JBC* 269:15469; Oyedotun and Lemire,1996. *MCB* 16:31382; Bullis and Lemire,1997. *JBC* 272:6543
	线粒体 H^+-ATPase(如 *ATP5*,*ATP9*)[f]	Jean-Frrancois et al. ,1988. *BBA* 933:223; Uh et al. , 1990. *JBC* 265:19047
	内膜易位酶(如 *TOM17*, *TOM23*, *TOM54*)[c,f]	Lithgow et al. ,1995. *TIBS* 20:98; Pfanner et al. ,1997. *Annu. Rev. Cell Devel. Biol.* 13:25; Pfanner and Meijer,1997. *Curr. Biol.* 7:R100; Blom et al. ,1998 *MCB* 18:309
	内膜蛋白酶(*IMP1*,*IMP2*)	Nunnari et al. ,1991. EMBO J. 10: 1997; Schneider,1991. MCB 34:401
膜间隙	细胞色素 b2(*CYB2*)和细胞色素过氧化物酶(*CCP1*)	Mathews and Wittenberg,1979. *JBC* 254:5991; Daum et al. ,1982. *JBC* 257:13028; Daum et al. ,1982. *JBC* 257:13075; Brown and Trumpower,1995. *J. Bacteriol.* 177:1380
基质	延胡索酸酶(*FUM1*)和乌头酸酶(*ACO1*)；二者也存在于胞浆中	Daum et al. ,1982. *JBC* 257:13075; Gangloff et al. ,1990. *MCB* 10:3551; Stein et al. ,1994. *MCB* 14:4770
细胞核		
核基质	DNA,组蛋白,其他 DNA 结合蛋白	Fukuma et al. ,1994. *Yeast* 10:319; Patterton et al. ,1998. *JBC* 273:7268

续表

亚细胞分离物	标记分子(及相应基因)[a,b]	可借鉴的参考文献[c]
核仁	38kDa 酵母纤维蛋白(*NOP1*)	Aris and Blobel,1998. *JCB* 107: 17; Henriquez et al. ,1990. *JBC* 265:2209
核膜	核孔复合体(如 *POM152*)膜蛋白(如 *SPO7*,*NEM1*);也存在于 ER 中	Wozniak et al. ,1994. *JCB* 125:31 Siniossoglou et al. ,1998. *EMBO J*. 17:6449
囊泡		
膜	碱性磷酸酶(*PHO 8*)[e]	Klionsky and Emr,1989. *EMBO J*. 8:2241; Horazdovsky et al. ,1995. *Curr. Opin. Cell Biol*. 7:544
	二肽氨基肽酶 B(*DAP2*)	Roberts et al. ,1989. *JCB* 108: 1363; Klionsky et al. ,1990. *Microbiol. Rev.* 54:266
	囊泡 SNARE(*VAM3*)	Darsow et al. ,1997. *JCB* 138:517
	V-ATPase[f]: 例如, 100kDa 亚基(*VPH1*)[e], 60kDa 和 69kDa 亚基(*VMA1*,*VMA2*)[e,g]	Kane et al. ,1997. *JCB* 138:517; Kane et al 1992. *JBC* 267:442; Manolson et al. , 1992. *JBC* 267: 14294; Nelson and Klionsky,1996. *Experentia* 52:1101
管腔	囊泡酶:例如,羧肽酶 Y(*PRC1*)[e],蛋白酶 A(*PEP4*),蛋白酶 B(*PRB1*),氨基肽酶 Ⅰ(*LAP4*),羧肽酶 S(*CPS1*)[h]	Jones,1990. *Methods Enzymol*. 185:372; Klionsky et al. ,1990 *Microbiol. Rev.* 54:266; Klionsky et al. 1992. *JCB* 119:287; Spormann et al. ,1992. *JBC* 267: 8021; Horazdovsky et al. ,1995. *Curr. Opin. Cell Biol*. 7:544; Van Den Hazel et al. ,1996. *Yeast* 12:1; Odorizzi et al. ,1998. *Cell* 95:847
内质网		
膜	多萜醇 P-甘露糖基转移酶(*DPM1*)[e]	Orlean et al. ,1988. *JBC* 263:17499; Forsee et al. ,1997. *Eur. J. Biochem*. 244:953
	多萜醇 P-葡萄糖合成酶(*ALG5*)	Heesen et al. ,1994. *Eur. J. Biochem* 224:71
	NADPH-细胞色素 P-450 还原酶(*NCP1*)	Venkateswarlu et al. ,1998. *JBC* 273:4492
	HMG-CoA 还原酶(*HMG1*,*HMG2*)	Hsmpton and Rine,1994. *JCB* 125:299
	蛋白质翻译复合体(例如,*SEC 61*,*SEC 62*,*SSS1*,*SSH1*)[f]	Corsi and Schekman,1996. *JBC* 271:30299; Lyman and Schekman,1996. *Experentia* 52:1042
	寡糖基转移酶(例如,*WBP1*,*OST1-5*,*STT3*,*SWP1*)	te Heesen et al. ,1993. *EMBO J*. 12:279; Silberstein and Gilmore,1996. *FASEB J*. 10:849; Karaoglu et al. ,1997. *JBC* 272:32513
	核糖体及转录复合体(*RER*)[f]	Sanderson and Meyer,1991. *JBC* 266:13423; Planta and Mager,1998 *Yeast* 14:471
管腔	甘露糖基转移酶(如 *PMT1-4*) Bip(*KAR2*)	Gentzsch and Tanner,1996. *EMBO J*. 15:5752 Normington et al,1989. *Cell* 57:1223; Rose et al. ,1989. *Cell* 57:1211
	蛋白二硫键异构酶(*PDI1*)	LaMantia and Lennarz,1993. *Cell* 74:899
胞浆	3-磷酸甘油酯激酶(*PGK1*)[i]	Perkins et al. ,1983. *Biochem. J*. 1211:199
	甘油-3-P 脱氢酶(*GPD1*)	Albertyn et al. ,1994. *MCB*14:4135
	葡萄糖-6-P-脱氢酶(*ZWF1*)[i]	Nogae snd Johnston,1990. *Gene* 96:161

续表

亚细胞分离物	标记分子(及相应基因)[a,b]	可借鉴的参考文献[c]
转运囊泡		
ER-Golgi	COPⅡ蛋白(例如,*EMP24*,*SEC23*[g] *SEC24*[g]);Emp24p也存在于ER中	Schimmoller et al.,1995. *EMBO J*. 14:1329; Schekman and Orci,1996 *Science* 271:1526; Matsuoka et al.,1998. *Cell* 93:263
Golgi-ER	COPⅠ蛋白(例如,*COP1*,*RET2*,*RET3*)[g]	Letourneur et al.,1994. *Cell* 79:1199; Gaynor et al.,1998. *BBA* 1404:33
高尔基体间	Sec7p(*SEC7*)[g]	Franzusoff et al.,1991. *Methods Enzymol*. 194:662
高尔基体后	网格蛋白(*CHC1*,*CLC1*)[g]	Lemmon et al.,1988. J. *Cell Biochem*. 36:329; Chu et al.,1996. *JBC* 271:33123
	SNARE蛋白(*SNC1*,*SNC2*)	Protopopov et al.,1993. *Cell* 74:855
分泌的(管腔)	转化酶(*SUC 2*);低浓度葡萄糖诱导	Klionsky et al.,1993. *MCB* 8:2105
	酸性磷酸酶(*PHO 5*);低浓度磷酸诱导	Vogel and Hinnen,1990. *Mol. Microboil*. 4:2013

a. 除有特殊提示外,膜相关蛋白均为膜整合蛋白。

b. 简称:ER,内质网;PM,质膜;RER,粗面内质网。

c. 期刊简称:*BBA*, *Biochim Biophys Acta*; *JBC*, *J. Biol. Chem*; *JCB*, *J. Cell Biol*; *MBC*, *Mol Biol Cell*; *MCB*, *Mol Cell Biol*.

d. 尽管这些蛋白质主要定位于后高尔基体,它们也往返于并来源于胞内体。

e. 特异性的单克隆抗体购自 Molecular Probes.

f. 膜周及膜整合蛋白复合物。

g. 膜周蛋白。

h. 经处理的羧肽酶S的囊泡形式是可溶蛋白,其前体形式是膜整合蛋白。注意在蛋白酶缺陷的突变酵母菌中,羧肽酶S经处理后不能得到其可溶形式。

i. 多抗血清购自 Sigma。

表 3.9.4 与亚细胞器相关的酶活性

主要定位	标志酶活性	可借鉴的参考文献[a]
内质网		
膜	NAPDH-细胞色素c还原酶	Kubota et al.,1977. J. *Biochem*. 81:197; Roberts et al.,1991. *Methods Enzymol*. 194:644
	多萜醇磷酸甘露糖合成酶	Marriott and Tanner,1979. J. *Bacteriol* 139:566; Heesen et al.,1994. *Eur. J. Biochem* 224:71
	转录活性(粗面内质网)[b]	Sanderson and Meyer,1991. *JBC* 266:13423
高尔基体		
膜,顺面	α1-6-甘露糖基转移酶(Och1p)	Nakayama et al.,1992. *EMBO J*. 11:2511
	GDP酶	Abeijon et al. 1989. *PNAS* 86:6935
膜,中间	α1-3-甘露糖基转移酶(Mnn1p)	Nakajima and Ballou,1975. *PNAS*72:3912
膜,反面	二肽氨基肽酶A(热稳定)	Julius et al.,1984. *Cell* 36:309; Roberts et al.,1991. *Methods Enzymol* 194:644
	Kex2p	Brenner et al.,1994. *Methods Enzymol*. 244:152
高尔基体后分泌囊泡		
管腔	转化酶;低浓度葡萄糖诱导	Goldstein and Lampen,1975. *Methods Enzymol*. 42:504;

续表

主要定位	标志酶活性	可借鉴的参考文献[a]
		Holcomb et al. ,1987. *Anal. Biochem.* 166:328;
		Walworth and Novick,1987. *JCB* 105:163
	酸性磷酸酶;低浓度磷酸诱导	Van Rijn et al. ,1972. *BBA* 268:431;
		Holcomb et al. ,1988. *JCB* 106:641
质膜		
膜	H^+-ATPase(钒酸盐敏感的)[c]	Willsky,1979. *JBC* 254:3326;
		Serrano,1988. *Methods Enzymol*. 157:533;
		Serrano,1988. *BBA* 947:1
	几丁质合成酶;也在几丁质体中	Bowman and Slayman,1979. *JBC* 254:2928
囊泡		
膜	碱性磷酸酶(ALP)	Roberts et al. ,1991. *Methods Enzymol*. 194:644
	α-甘露糖苷酶	Opheim,1978. *BBA* 524:121;
		Roberts et al. , *Methods Enzymol*. 194:644
	二肽氨基肽酶 B(热敏感的)	Roberts et al. ,1991. *Methods Enzymol*. 194:644
	H^+-ATPase(巴弗洛霉素敏感的)[c]	Roberts et al. ,1991. *Methods Enzymol*. 194:644
基质	羧肽酶 Y(CPY)	Jones,1991. *JBC* 266:7963
	羧肽酶 S(CPS)	Distel et al. ,1983. *BBA* 741:128
	蛋白酶 A(PrA),蛋白酶 B(PrB)	Jones,1991. *JBC* 266:7963
	氨基肽酶Ⅰ(APⅠ)	Distel et al. ,1983. *BBA* 741:128
过氧化物酶体		
外周膜	乙酰 CoA 氧化酶[b]	Dommes et al. ,1981. *JBC* 256:8259;
		Kionka and Kunau,1983. *J. Bacteriol*. 161:153
基质	过氧化氢酶 A	Luck,1963. *Methods Enz. Anal*. p. 885;
		Ueda et al. , 1991. *Methods Enzymol*. 188:463;
	3-酮酰基 CoA 硫解酶	Kionka and Kunau,1983. *J. Bacteriol*. 161:153
	柠檬酸合成酶	Lewin et al. ,1990. *MCB* 10:1399
线粒体		
内膜	细胞色素 c 氧化酶	Mason et al. ,1973. *JCB* 248:1346;
		Poyton et al. ,1995. *Methods Enzymol* 260:97
	琥珀酸脱氢酶	Ackrell et al. ,1978. *Methods Enzymol* 53:466
	H^+-ATPase(寡霉菌素敏感的)[c]	Roberts et al. ,1991. *Methods Enzymol*. 194:644
内膜间隙	细胞色素 b2	Daum et al. ,1982. *JBC* 257:13075
	细胞色素 c 过氧化物酶	Daum et al. ,1982. *JBC* 257:13028
基质	延胡索酸酶	Daum et al. ,1982. *JBC* 257:13028
胞浆		
细胞溶胶	葡萄糖-6-磷酸脱氢酶	Roberts et al. ,1991. ,*Methods Enzymol*. 194:644

a. 期刊简称:*BBA*, *Biochim Biophys Acta*; *JBC*, *J. Biol. Chem*; *JCB*, *J. Cell Biol*; *MCB*, *Mol. Cell Biol*; *PNAS*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*

b. 膜周蛋白。

c. 膜周及膜整合蛋白复合物。

表 3.9.5　组分特异性的翻译后蛋白质修饰

组分	翻译后的蛋白质修饰	组分	翻译后的蛋白质修饰
线粒体		高尔基体	
内膜间隙	血红素附着	顺式膜囊	始于 α1-6-连接寡糖的附加
	膜锚定剪切		α1-6-连接寡糖的延伸
基质	导肽剪切	中间膜囊	α1-3-连接寡糖的附加
内质网			α1-2-连接寡糖的附加
			O-连接寡糖的延伸
管腔	信号肽剪切	反式膜囊	赖氨酸精氨酸双残基的蛋白内水解
	核心 *N*-连接 a 寡糖的附加		经二肽氨基肽酶 A(DPAP-A)的剪切
	核心 *O*-连接 a 寡糖的附加	囊泡	
	从 *N*-连接的寡糖链上切割葡萄糖	管腔	前体肽剪切和水解酶激活

a. *N*-连接，天冬氨酸连接；*O*-连接，丝氨酸或苏氨酸连接。

表 3.9.6　绝大多数亚细胞组分分离实验通用的关键参数

实验过程	关键参数
细胞株的选择和生长	使用囊泡蛋白酶缺陷细胞株可以将蛋白裂解降至最小
	如果与实验目的不冲突的话，使用那些能使方案最优化的细胞株，只是其结果因细胞株和生长条件而有不同
	从新鲜的平板上挑取单个酵母集落（理想情况下是从上周内冻存的菌株制备）并将其接种至培养基内
	用分光光度计确定生长期、OD_{600}值与菌株的存活细胞数、生长条件之间的关系
	为了产生均一的、有活性的细胞群，要将细胞培养至少 16～24h，以确保其进入对数生长期
	为了纯化过氧化物酶体、线粒体，在收集前可将细胞置于诱导培养基内作预培养（如油酸盐或乳酸培养基）
	在对数生长期的中段收集细胞（除有特殊要求外）
试剂和仪器	使用 Ultrapure 试剂（或同类产品），所有溶液用双蒸水配制
	确保玻璃器皿是干净的并且是彻底地洗去了洗洁剂
	提前制备试剂和溶液（除有特殊要求外）
	将试剂预先置于合适温度下
	提前标记好试管以节省时间，使错误减少到最小
	事先准备好关键仪器，若需要可预冷
制备原生质体	以处于分裂期的均一细胞群为材料（有特殊要求的除外）
	以小规模的预实验确定每一菌株及其最适生长条件
	用 DTT 或 2-ME 预处理细胞以破坏细胞壁中的二硫键
	提供充分的渗透压支持（通常使用 1～1.5mol/L 的山梨醇）
	用酶解酶 100T 或其他制备的葡聚糖酶消化细胞壁
	温和地处理原生质体（例如，切忌涡旋振荡）
	利用显微镜或在水中的不稳定性监测细胞壁的消化情况（支持方案）
	在进入细胞裂解步骤前，洗去原生质体中残留的葡聚糖酶和造成污染的酶
玻璃珠细胞裂解法	使用直径约 0.45mm 的酸洗过的玻璃珠
	玻璃珠预冷至 4℃
	在加入玻璃珠前，用缓冲液重新悬浮细胞沉淀
	细胞悬液与所用玻璃珠体积比约为 1∶1
	每隔 30～45s 就用冰水浴冷却裂解液

续表

实验过程	关键参数
	最低限度地减少泡沫产生。要是使用涡旋振荡器搅拌样品，要注意什么样的速度、压力和角度易产生气泡
	利用显微镜监测裂解情况（并用甲基蓝处理）
	在有良好的散热条件和很少有气泡产生的情况下，小珠搅拌器可用于处理较大体积的样品（2～200ml）
制备裂解液	将样品保存于 0～4℃（除有特殊要求外）
	临用前向溶液中加入新鲜的蛋白酶抑制剂
	使用成分和渗透压合适的缓冲液（可能要凭经验决定）
	可使用匀浆技术，这样能权衡既要裂解细胞又要获得完整细胞器这两种要求，尽量减少泡沫产生
	温和地处理裂解物，因为许多亚细胞组分易被破坏（例如，避免使用窄口移液器吸头用力地吹打以及用涡旋振荡器混合）
组分分离	每步要保留样品以监测每一步骤的回收水平及标记物分布
	实验操作要尽量快，要小心，要连续
	将样品保存于 0～4℃（除有特殊要求外）
制备梯度溶液	检测梯度液是否能破坏目的蛋白间的作用
	制备模拟梯度液并检测它们的密度，以确保梯度液制备过程的精确性和可重复性
	使用前将梯度液预冷至 4℃
	临用前制备分级梯度液，使液层清晰
	采用缓慢加速及减速的设定。为使液层间的混合程度降至最低，在转速降至 1000r/min 之后，转头靠惯性而停止下来
收集梯度溶液	在收集前注意所有的条带、沉淀及其他特征
	保留所有分离组分，直到确认哪些组分不需要
	每份组分要保留一小部分以检测其密度
	在收集每份梯度液时，将其余的保存在 4℃冰箱
	如果使用移液器收集，收集不同成分时要换吸头
	如果要求细胞器的完整性，那么就要温和地处理各组分（例如，避免使用窄口移液器吸头用力地吹打以及用涡旋振荡器混合）
	实验操作要尽量快，要小心，要连续
分离组分的分析	明确多种标记分子的定位及定量（见表 3.9.3 和表 3.9.4）
	如果影响分析的话，要去除梯度基液（如通过离心）
	如果要求细胞器保持完整，那么就要温和地处理各组分（例如，避免使用窄口移液器吸头用力地吹打以及用涡旋振荡器混合）
	要记住，亚细胞成分在给定分离组分中的共定位并不意味着其在体内也共定位
	可选用步骤：检测细胞器的整体性和（或）功能
	理想的是，使用其他技术可证实这些结果并可以解释得通

表 3.9.7　酵母细胞组分分离中的疑难解答

问题	可能的原因	可能的解决办法[a]
消化细胞壁的效率低	细胞老化和或处于静止阶段（该阶段细胞壁厚）	绘制细胞株与生长条件间的生长曲线 稀释或重新开始培养，使细胞生长若干代，直到其达到所需要的生长期为止

续表

问题	可能的原因	可能的解决办法[a]
	细菌污染	使用光学显微镜检查污染
		如果必要，使用无菌试剂开始新的酵母培养
	酶活性水平低或孵育时间不足	如果需要，购买或制备新鲜的酶储存液
		以小规模实验确定最佳条件（如酶浓度、还原试剂处理的时间、消化时间）
	使用的细胞株细胞壁特别厚、坚硬（如突变细胞、接近于静止生长阶段的细胞）	以小规模实验确定最佳条件
裂解细胞的效率低（原生质体）	消化细胞壁的效率低	如上所述
	破坏原生质体的机械力量不足和/或过多的渗透压支持	增加匀浆化的强度和时间（例如，使用紧密型研磨棒；多次搅动；采用不同的裂解技术；缓冲液的渗透压支持要弱）。但这些步骤往往促进细胞内成分的破坏
裂解细胞的效率低（完整细胞）	玻璃珠大小不合适	裂解细胞所需的玻璃珠直径应为0.45～0.55mm
	在加入玻璃珠前，细胞没有被重悬浮	在加入玻璃珠前，用缓冲液重悬浮细胞沉淀
	产生过多的气泡	用测试样品确定最佳条件。改变管或涡旋振荡的角度也许会有所改善
	搅动的强度或时间不足	增加搅动的时间（间歇性地放于冰上冷却）。以测试样品确定最佳条件
	玻璃珠与细胞比例不是最佳	通常情况下，细胞悬液与玻璃珠的比例为1∶1是最佳工作状态。细胞悬液与缓冲液比例约为1∶1
	细胞老化和或处于静止阶段（该阶段细胞壁厚）	绘制细胞株与生长条件间的生长曲线
		稀释或重新开始培养，使细胞生长若干代，直到其达到所需要的生长期为止
	使用的细胞株细胞壁特别厚、坚硬（如突变细胞、接近于静止生长阶段的细胞）	以小规模实验确定最佳条件
蛋白质裂解	裂解细胞后暴露于>4℃的温度	尽可能地将样品保存于0～4℃。将溶液和仪器预冷至4℃，尽量使用冰和冰水浴
	蛋白酶抑制剂浓度或特异性范围不合适	增加蛋白酶抑制剂混合液的浓度并改变其组成
		在裂解细胞前后，向所有溶液中添加蛋白酶抑制剂混合液
		多次添加PMSF（由于它在水溶液中半衰期短）
		制备新鲜的蛋白酶抑制剂储存液（如果储存时间较久或储存条件差）
	长时间暴露于水解酶中	实验操作要尽量快，将样品置于冰上
		使用囊泡蛋白酶缺陷细胞株（如pep4，prb1）
		使用更加温和的匀浆技术，增加裂解缓冲液的渗透压支持和/或在整个实验过程中温和地处理样品，可以将囊泡裂解降至最小（对*PEP4*株尤为重要）
		尽快将目的成分与蛋白酶分开（如限制其暴露于含能释放囊泡酶的细胞溶胶中）
密度梯度液分离效果差	梯度液过负载	减少铺于梯度液上的样品量
	膜聚集	见下页

续表

问题	可能的原因	可能的解决办法[a]
	裂解细胞不当	见上页
	梯度密度液的密度范围和(或)制备不够理想	以小规模实验确定最佳条件
膜聚集	膜沉淀的重悬浮不充分	膜沉淀于一铺垫上(而不是附着于管壁)
		将沉淀步骤的数量和/或强度最小化
		增加重悬浮步骤的数量和/或时间(例如,在小型匀浆器中重悬浮膜沉淀或利用小的移液器吸头或针头操作)
		将重悬浮膜的缓冲液置于冰上
	材料过多	使用较少的材料或较多的缓冲液
	清洗步骤太长	低速旋转可清洗裂解液中部分裂解的细胞(如 500*g*)
	缓冲液组成不是最佳	缓冲液组成会造成聚集成团(如高 Mg^{2+} 浓度)添加一些 1～2mmol/L DTT 或 2-ME 可使聚集成团程度降至最小。EDTA 也有此作用
	匀浆化不充分	增加匀浆化的强度和时间(例如,使用紧密型研磨棒;多次搅动;采用不同的裂解技术;缓冲液的渗透压支持要弱)。但这些步骤往往促进细胞内成分的破坏
	细胞核释放 DNA	温和地处理样品使细胞核的损伤降至最小(见下)
		如果必要,使用 DNase,浓度为 10μg/ml
对亚细胞成分的破坏	渗透压支持不充分或渗透压支持快速改变	增强渗透压支持。避免缓冲液快速改变
	高水平的蛋白质裂解	增强渗透压支持。避免缓冲液快速改变
	外周膜蛋白的丢失和(或)蛋白复合体的破坏	使用其他缓冲液或梯度基液。
		有些缓冲液或梯度基液可以破坏蛋白质相互作用的稳定性。以小规模实验确定最佳条件
	反复吹打、沉淀和(或)重悬浮	膜沉淀在一铺垫上(而不是附着于管壁)
		温和地处理沉淀(例如,剪掉移液器吸头来扩大开口口径,开始重悬浮时轻轻地敲打管,缓慢地吹打等)
	匀浆化不够温和	避免使用搅动玻璃珠使细胞裂解
		使用更为温和的方法进行裂解及匀浆化原生质体(例如,DEAE-易化的等渗裂解法,用间隙更大的 Dounce 匀浆器),使用光学显微镜监测裂解物的情况
蛋白质和(或)酶活性的回收率低	暴露于活跃的水解酶中	见上
	膜整体性被破坏及丢失管腔的成分	见上
	外周膜蛋白的丢失和(或)蛋白复合体的破坏	使用其他缓冲液或梯度基液
		有些缓冲液或梯度基液可破坏蛋白质相互作用的稳定性

续表

问题	可能的原因	可能的解决办法[a]
	梯度基液可能会干扰酶活性检测和(或)液闪测定	使用合适的技术(如离心、透析)去除梯度基液。如果必要,选择其他的梯度基液
膜回收率低	膜回收率低	见下
	细胞裂解不足	见上
	匀浆化不当	增加匀浆化的强度和时间(例如,使用紧密型研磨棒;多次搅动;采用不同的裂解技术;缓冲液的渗透压支持要弱)。但这些步骤往往促进细胞内成分的破坏
		重复匀浆低速离心所得沉淀物
	膜聚集	见上
	由于不成熟的原生质体裂解方法导致原生质体的回收率低	增强渗透压支持(升至 1.5mol/L 山梨醇的水平)
		温和地处理原生质体(例如,沉降原生质体于铺垫上或通过一铺垫,剪掉吸头以扩大吸孔大小,轻缓地晃动,缓慢地温和地吹打以重新悬浮原生质体,切忌涡旋振荡)

a. 这些可行的方法不适用于实验的所有目的,只推荐用于与后续步骤及最终结果不冲突的实验。在绝大多数情况下,这些问题不可能完全被解决。此外,必须进行预实验来针对特殊的要求以确定最佳实验条件。

注意: 本单元中所有关于酵母菌的参考文献中涉及的均为出芽酿酒酵母,许多针对酿酒酵母而设立的方案不能直接用于其他无明显修饰的酵母菌,如裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)。针对酿酒酵母的方案适用于许多不同的酿酒酵母,但由于亚种间的区别和生长条件的不同,可能要对给定的方案做出调整。

注意: 细胞裂解过程及后续步骤要在0~4℃进行(除非有特殊的要求)。此外,在细胞裂解过程及后续步骤中,溶液和仪器在使用前必须被冷却到0~4℃(除非有特殊的要求)。

注意: 苯甲基氟化硫(PMSF)及其他蛋白酶抑制剂是有毒的,操作时要小心谨慎。应当在临用前加入溶液。

基本方案1　利用差速离心法分离原生质体组分

差速离心法能依照原生质体中各个亚细胞组分的大小,粗略地将它们分开。之所以该方法是绝大多数亚细胞组分分离实验的一部分,是因为通过此法能获得丰富的细胞器或膜成分,并去除多余的组分和(或)减少样品的体积。差速离心法也能用于对感兴趣的蛋白质进行潜在的亚细胞定位分析。

材料(带√项见附录1)

实验所需的酵母菌培养至对数生长期

√终止液或原生质体培养基B,冰冷的

√HEPES/乙酸钾(HEPES/KAc)裂解缓冲液,冰冷的

√500×蛋白酶抑制剂的混合液 A 及 B（500×PIC-A 及 500×PIC-B）

√蛋白酶抑制剂储存液 A

Dounce 玻璃匀浆器，配有紧密型研磨棒，预冷至 4℃

1.6ml 微量离心管，预冷至 4℃

微量离心机，预冷至 4℃

可用于 100 000g 超速离心的 1.6ml 聚碳酸酯离心管，冰上预冷

Beckman 制冷台式超速离心机（或同类产品）及转头（如 Beckman TLA100.3 或同类产品）

1. 对实验所需的酵母菌进行培养并制备原生质体（支持方案，步骤 1～11）。

   如果与实验目的不冲突的话，可使用蛋白酶缺陷株以减少蛋白质降解（例如，BJ3505 是 pep4 prb1 突变酵母菌株）。

2. 用冷的终止液、原生质体培养基 B 或其他具有合适渗透压的溶液悬浮原生质体，使其浓度达 5～10 OD_{600} 单位/ml。用手轻缓地晃动管，用玻璃棒慢慢地搅拌或用广口移液器缓慢吹打以悬浮原生质体。切忌涡旋振荡。将悬液保存于冰上以备下步使用。

3. 4℃，1500g 离心 5min，收集原生质体。避开松散的、绒毛状沉淀，吸出或弃掉上清液。用冰冷的 HEPES/KAc 裂解缓冲液悬浮原生质体，使其浓度达约 5 OD_{600} 单位/ml。

4. 将悬液移至 Dounce 匀浆器中，匀浆器已放置于冰桶中预冷。使用紧密型研磨棒上下反复搅动 10 次，破坏原生质体。将裂解液分配至多个冷的 1.6ml 微量离心管中。

5. 4℃，300g 离心 5min，以去除裂解液中的未裂解细胞、部分裂解的细胞及细胞团。小心地吸出上清液（S_{300}）移至新的预冷的 1.6ml 管中，不要破坏非常松散的、绒毛状沉淀（P_{300}），记录移出的 S_{300} 的体积。

6. 可选用步骤：使用微量加样器并配以 200μl 吸头反复吹打 10 次，以悬浮 P_{300}。向其中加入 HEPES/KAc 裂解液至总体积 500μl，用末端修剪过的吸头或涡旋振荡加以混匀。重复步骤 5。将第一份和第二份上清液 S_{300} 混合在一起。

7. 使用微量离心机，在 4℃条件下将上清液以 13 000g 的速度离心 10min。将上清液（$S_{13\,000}$）小心地移至预冷的 1.6ml 聚碳酸酯超速离心管中，保存在冰上。将含有 $P_{13\,000}$ 样品的小离心管于 4℃，13 000g 离心 30s，以去除沉淀上及管壁上所有的残留液，小心地吸去沉淀表面所有的 $S_{13\,000}$。

8. 用新鲜添加蛋白酶抑制剂（PIC-A、PIC-B、蛋白酶抑制剂储存液 A）的冰冷的 HEPES/KAc 裂解液（或其他合适的缓冲液）悬浮 $P_{13\,000}$ 沉淀。使用移液器或涡旋振荡简单地加以混匀，盖好盖置于冰上。迅速进行步骤 9 的操作。

9. 如果需要，可以添加 HEPES/KAc 裂解液以平衡 $S_{13\,000}$ 样品。使用固定角度型转头，在 4℃条件下，将 $S_{13\,000}$ 样品以 100 000g 的速度离心 60min。

10. 可选择步骤：在上述 60min 的离心过程中，可根据需要进一步处理 $P_{13\,000}$ 沉淀物。

11. 超速离心后，将上清液（$S_{100\,000}$）小心地移至预冷的、干净的微量离心管中，并置于冰上。为了去除沉淀（$P_{100\,000}$）及管壁上所有的残留液，将含有 $P_{100\,000}$ 样品的小离心管于 4℃，13 000g 离心 30s，小心地吸去 $P_{100\,000}$ 沉淀表面所有残留的上清。

12. 用新鲜添加蛋白酶抑制剂的冰冷 HEPES/KAc 裂解缓冲液（或其他适宜的缓冲液）

悬浮 $P_{100\ 000}$ 沉淀，使用移液器或涡旋振荡快速地加以混匀。置于冰上直到使用时。

$P_{100\ 000}$ 沉淀通常很难重新悬浮，如果将膜打散对后续实验很重要的话，可以将悬液移至小的预冷 Dounce 匀浆器中使用研磨棒上下反复搅动直到沉淀被打散。将沉淀与缓冲液置于冰上共孵育，这可以使沉淀变“软”，也有助于悬浮沉淀。若是在后续实验中不需要保留完整的膜，可以使用超声水浴，这样沉淀可以在很小体积的缓冲液中快速地悬浮起来。

支持方案　应用酶解酶制备酵母原生质体

补充材料（同见基本方案 1；带√项见附录 1）

在含酵母提取物/蛋白胨/葡萄糖（YPD）的培养基（单元 1.6）或其他适宜的培养基中培养，处于指数生长期的酵母细胞

√TSD 还原缓冲液

√原生质体培养基 A

含5mg/ml 酶解酶 100T（ICN Immunobichemicals）的原生质体培养基 A（等量分装，储存于－20℃）

√原生质体培养基 B，冰冷

50ml 玻璃培养管或 100ml Erlenmeyer 培养瓶

30℃（或有助于该菌株生长的适宜温度）的摇床

250ml 离心瓶

50ml 离心管

离心机和转头（如 Sorvall GS-3 转头）

30℃水浴箱

1. 在本实验开始前一天的早晨，对实验所需的酵母菌进行预培养，即从新鲜的平板上挑取一个酵母集落，随后将其与 10ml YPD（或合适的培养基）共同孵育培养。在摇床中，30℃（或适宜的温度），225～325 r/min 摇一天。
2. 在本实验开始前一天的晚上，通过测定 OD_{600} 以确定预培养的细胞密度。为了更精确地测量，可先用水稀释培养基，比例为 1∶5 或 1∶10，测定 OD_{600} 值，然后再将测定值乘以 5 或 10。在 OD_{600} 为 0.1～0.3 的范围内，细胞数量与该值是成线性的。
3. 在完成下列计算以后，将合适数量经预培养的菌接种至新鲜培养基中，过夜生长。

    a. 计算所需培养基的量

    最小培养基用量（ml）＝(所需细胞数量的 OD_{600} 值/接种对象的 OD_{600} 值）×1.25

    b. 计算接种细胞的密度（OD_{600}）

    $$\text{接种 } OD_{600} = \text{接种对象的 } OD_{600} \text{ 值} \times 2^{(\text{双倍数目})}$$

4. 在需原生质体的当天早晨，测定培养细胞的 OD_{600}。继续培养直到它们的数量在所需细胞密度的范围内（即指数生长期的中间）。在室温下以 4000g 的速度离心 5min，小心地吸弃上清液，收集细胞。
5. 用 TSD 还原缓冲液重悬细胞，密度达 5～10 OD_{600} 单位/ml，并在室温下孵育 10

min。室温，4000g 离心 5min，弃上清液，收集细胞。

6. 用原生质体培养基 A 重悬细胞，密度达 20～300 OD_{600} 单位/ml。每管悬液吸出 10μl 并加 990μl 水稀释，短暂涡旋混匀。测定并记录起始 OD_{600} 值。
7. 向悬液中加入酶解酶 100T（5mg/ml 的储存液），每 OD_{600} 单位的细胞加 1～5μg。在 30℃（或适宜的温度下）孵育约 20 min。
8. 为了监测去除细胞壁的效率，可以用 990μl 水稀释 10μl 细胞悬液，涡旋混匀，静置 1～2 min 后，再次混匀，测定 OD_{600} 值。继续消化细胞壁，直到稀释的细胞悬液测定 OD_{600} 值小于起始值（步骤 6）的 5%，这提示大于 95%的细胞已经变为原生质体了。
9. 室温，1500g 离心 5min，收集原生质体。在不破坏松散的、绒毛状沉淀的前提下，小心地吸出或倒出上清液。
10. 以原生质体培养基 B 重悬原生质体，其密度达 1～5 OD_{600} 单位/ml，用手轻缓地转动管或用玻璃棒轻轻地搅拌。
11. 4℃，1500g 离心 5min，收集原生质体。倒出或吸出上清液。
12. 可选用步骤：重复步骤 10 及 11 以确保酶解酶及污染物已经被彻底清除。
13. 用冷的原生质体培养基 B、终止液或其他有合适渗透压的溶液悬浮原生质体。将悬液保存于冰上。

基本方案 2　应用 NYCODENZ 进行平衡密度梯度组分分离

Nycodenz 平衡密度梯度离心用于从胞内体及晚高尔基结构中分离囊泡膜。

材料（带√项见附录 1）

每份梯度溶液含 20 个 OD_{600} 单位的处于对数生长期中段的细胞分离物

√HEPES/乙酸钾（HEPES/KAc）裂解液，冰冷的

√50%（w/v）Nycodenz/山梨醇储存液

√含 37%、31%、27%、23%、20%、17%、13% 及 9%（w/v）Nycodenz 的 HEPES/乙酸钾裂解液，4℃

√500×蛋白酶抑制剂的混合液 A 及 B（500×PIC-A 及 500×PIC-B）

√蛋白酶抑制剂储存液 A

100mg/ml 牛血清白蛋白（BSA，可选用）

√终止液或其他适宜的缓冲液，冰冷的

开口修平的 1ml 移液器吸头（吸头开口向上剪掉约 5～10mm 以扩大开口）

干净的 14 mm×89 mm 的超速离心管（如 Ultraclear 14 mm×89 mm 管或同类产品）以及管架

4℃离心机和微量离心机

配有紧密型研磨棒的 Dounce 匀浆器，预冷的

1.6 ml 微量离心管，预冷的

冷冻超速离心机，配有水平型转头（如 Beckman SW41 Ti 或同类产品），4℃

折射率计

1. 在本实验开始前一天，对实验所需的酵母菌进行培养（支持方案，步骤 1～3）。

   如果与实验目的不冲突的话，可使用蛋白酶缺陷株以减少蛋白质降解（例如，TVY614、pep4 prb1 prc1 突变酵母株）。

2. 在本实验开始的当天早晨，稀释培养基使得能在下午早些时候收集细胞（见支持方案，步骤 3 的样品计算）。

3. 在本实验开始的当天早晨，用微量移液器和开口修平的 1ml 吸头制备梯度液。向每份梯度液中加入蛋白酶抑制剂。按下列顺序，从下至上，在 14 mm×89 mm 的超速离心管中小心地铺上以下体积的 Nycodenz 梯度液。

   1ml 37%

   1.5ml 31%

   1.5ml 27%

   1.5ml 23%

   1.5ml 20%

   1ml 17%

   1ml 13%

   1ml 9%

4. 在室温下静止保存梯度液 2～3h。数小时后放在 4℃使其在使用前变冷。

5. 一旦细胞生长到所需密度，就可以制备原生质体了（支持方案，步骤 4～11）。

6. 用终止液、冷的原生质体培养基 B 或其他具有合适渗透压的溶液重悬原生质体，使其浓度达 1～5 OD_{600} 单位/ml。用手轻缓地转动管，用玻璃棒轻轻地搅拌，或用广口移液器缓慢吹打以重新悬浮原生质体。切忌涡旋振荡。将悬液保存于冰上以备下步使用。

7. 4℃，2000g 离心 5min，收集原生质体，吸弃上清液。

8. 用冰冷的新鲜添加蛋白酶抑制剂（PIC-A、PIC-B、蛋白酶抑制剂储存液 A）的 HEPES/KAc 裂解液重悬原生质体，使其浓度达约 15 OD_{600} 单位/ml。将悬液移至 Dounce 匀浆器中，匀浆器已放置于冰桶中预冷。使用紧密型研磨棒上下反复搅动 10 次，破坏原生质体。

9. 将上步的裂解液分配至多个冷的 1.6ml 微量离心管中。在每管中加入适量体积（约 1.35 ml）的裂解液（约 20 OD_{600} 的细胞量）。使用微量离心机，4℃，300g 离心 5min，以去除未裂解的细胞、部分裂解的细胞及聚合的细胞，得到澄清的裂解液。

10. 在不破坏松散的、绒毛状沉淀（P_{300}）的前提下，小心地吸出上清液（S_{300}），随即将它们移至新的、冷的 1.6ml 管中。

11. 使用开口修平的 1ml 吸头小心地将上清液（S_{300}）铺于制备好的 Nycodenz 梯度液上（步骤 3～4）。记录转移 S_{300} 的体积。向重量轻的管中添加少量的 HEPES/KAc 裂解液，以平衡成对的提桶、梯度液和瓶盖。将添置好梯度液的提桶放入预冷的水平型转头中。

12. 使用 Beckman SW41 Ti 转头（或同类产品），4℃，170 000g 离心 15～18h，采用缓

慢加速及减速的设定以减少对所形成梯度的破坏。在减速过程中，取 14 个微量离心管做上标记，用于收集每个梯度组分，并将它们放于冰上。

13. 完成离心后，从转头的摆桶中小心地取出梯度液并将它们放于稳定的支架上。注意所有的明显的膜聚集物或其他特征。在取出每份梯度液时，将其余的置于 4℃，不要扰乱。
14. 使用一个微量移液器、开口修平的 1ml 吸头或自动分离组分收集器，从每份梯度液的顶部开始，收集约 14 管。涡旋混匀每份样品。4℃，13 000*g* 离心 15s，以清除瓶盖上的液滴。每份分离组分取出 30～40μl 移至新的微量离心管中，放在一边，室温下保留（以备步骤 16 使用）。
15. 按照要求处理分离的组分。
16. 用步骤 14 中保留下的 30～40μl 样品测定折射率以确定每份分离组分中 Nycodenz 溶液的密度。

基本方案 3　在蔗糖分级梯度液中进行 $P_{13\,000}$ 膜的组分分离

本方案是为分析一种或多种膜泡、质膜（PM）、早高尔基体及内质网膜（ER）中的蛋白质分子而设计的（见表 3.9.8）。

材料（带√项见附录 1）

实验所需的酵母菌（例如，TVY614，pep4 prb1 prc1 突变酵母株），每个梯度溶液约 $30OD_{600}$

√终止液、原生质体培养基 B，冰冷的（或其他有合适渗透压的缓冲液）

√HEPES/乙酸钾（HEPES/KAc）裂解液，冰冷的

√500×蛋白酶抑制剂的混合液 A 及 B（500×PIC-A 及 500×PIC-B）

√蛋白酶抑制剂储存液 A

√用蔗糖缓冲液配制的 1.2mol/L 及 1.5mol/L 蔗糖梯度溶液

Ultra-clear 11 mm×34 mm 的超速离心管（如 Beckman 或同类产品）

台式制冷超速离心机，配有水平型转头，4℃（如 BeckmanTLS55 或同类产品）

配有紧密型研磨棒的 Dounce 匀浆器，预冷

1.6ml 微量离心管

微量离心机，4℃

开口修平的 1ml 及 200μl 移液器吸头（把吸头尖端剪掉约 5～10mm）

1. 对实验所需的酵母菌进行培养（支持方案，步骤 1～3）。

   如果与实验目的不冲突的话，可使用蛋白酶缺陷株以减少蛋白质降解（例如，*TVY614*、*pep4 prb1 prc1* 突变酵母株）。
2. 制备原生质体（支持方案，步骤 4～11）。
3. 用终止液、冰冷的原生质体培养基 B 或其他具有合适渗透压的溶液重悬原生质体。用手轻缓地转动管，用玻璃棒轻轻地搅拌，或用广口移液器缓慢吹打以重新悬浮原

生质体。切忌涡旋振荡。将悬液保存于冰上以备下步使用。

4. 4℃，2000g 离心 5min，收集原生质体。吸去上清液，用冰冷的 HEPES/KAc 裂解液轻轻悬浮原生质体，使其浓度达约 5 OD_{600}单位/ml。
5. 将悬液移至 Dounce 匀浆器中，匀浆器要放置于冰桶中预冷。使用紧密型研磨棒上下搅动 10 次，破坏原生质体，将裂解液移至多个冷的 1.6 ml 微量管中。
6. 4℃，300g 离心 5min，去除未裂解的细胞、部分裂解的细胞及聚合的细胞，使裂解液澄清。小心地吸出上清液（S_{300}），不要破坏很松散的、绒毛状沉淀（P_{300}），将上清液移至新的冷的 1.6ml 管中。
7. 用微量移液器和 200μl 钝口移液器吸头反复吹打 10 次以悬浮 P_{300}。加入冰冷的 HEPES/KAc 裂解液至 1ml，反复上下吹打多次以混匀。
8. 重复步骤 6。
9. 将第一次的和第二次的上清液 S_{300}（源自步骤 6 和 8）合在一起并混匀。将混合上清液（S_{300}）转移至冷的 1.6ml 微量离心管中，并放于冰上。将上清液 S_{300}置于微量离心机内，4℃，13 000g 离心 10min。
10. 将上清液 $S_{13\,000}$移至新的 1.6ml 管中。将上清液 $S_{13\,000}$保存于冰上，直到制备 $P_{13\,000}$膜梯度组分分离物（步骤 15）。
11. 在 4℃条件下，将含有 $P_{13\,000}$的样品以 13 000g 的速度离心约 45s，以清除 $P_{13\,000}$沉淀上的残留上清液，小心地吸出沉淀物上的残留液并弃掉。

表 3.9.8 清亮的酵母菌原生质体裂解液（S_{300}）连续在 13 000g 和 100 000g[a] 的速度下离心后，细胞器膜的分布情况

亚细胞组分	$P_{13\,000}$	$P_{100\,000}$
胞内体膜[b]	约 30%～70%	约 30%～70%
内质网[c]	>95%	
高尔基体(顺面膜囊)	约 30%～60%	约 40%～70%
高尔基体(中间和反面膜囊)	约 10%～30%	约 70%～90%
线粒体	>95%	
细胞核[c]	>95%	
过氧化物酶体(油酸盐诱发的)	>95%	
质膜[c]	>95%	
转运膜泡		>95%
囊泡膜	>95%	

a. 菌株:SEY6210。可参考文献:Gaynor et al. (1994); Marcusson et al. (1994); Cereghino et al. (1995); Zinser and Daum (1995); Rieder and Emr(1997); Babst et al. (1998).

b. 胞内体膜系统被认为至少由两种不同类型组分组成的。在低速离心时,晚期前囊泡胞内体相对于早期高尔基后胞内体组分容易形成沉淀。

c. 多于 50%的上述膜结构在 300g 的净化离心阶段就能形成沉淀。通过重悬浮和再次离心上述沉淀可以提高产量,但损失是不可避免的。

12. 用 200μl 新鲜添加蛋白酶抑制剂（PIC-A、PIC-B、蛋白酶抑制剂储存液 A）的冰冷 HEPES/KAc 裂解液悬浮相当于约 20 OD_{600}单位的 $P_{13\,000}$膜。用微量移液器和 200μl 的移液器吸头反复吹打每一份 $P_{13\,000}$悬液至少 20 次，以确保 $P_{13\,000}$沉淀分散开。将

沉淀混合并反复吹打多次以混匀。

13. 小心地吸取 800μl 1.5mol/L 蔗糖梯度液放入超净的 11 mm×34 mm 的超速离心管中。用开口修平的 1ml 吸头吸取 800μl 1.2mol/L 蔗糖分级梯度液铺于 1.5mol/L 蔗糖梯度液之上。
14. 用开口修平的 200μl 移液器吸头吸取 180μl $P_{13\,000}$ 悬液（来自步骤 12），将其铺于 1.2mol/L 蔗糖梯度液之上。如果需要，可向重量轻的管中添加少量的 $P_{13\,000}$ 悬液，以平衡成对离心的梯度液。将添置好的梯度液放于水平型转头中，转头要预冷。
15. 4℃，85 000g 离心 1h，采用缓慢加速及减速的设定以减少对梯度的破坏。在减速过程中，将 6 个用于收集梯度分离组分的微量离心管做上标记，并将它们放在冰上。将 1ml 的移液器吸头的尖端剪掉约 5～10mm（即每份梯度液 6 个吸头）。
16. 完成离心后，从摆桶中小心地取出梯度液并将它们放于稳定的支架上。将梯度液置于 4℃，不要扰乱，一次处理一个梯度液。对条带的位置、外观及任何其他明显的特征做好记录。
17. 使用微量移液器和剪短的 1ml 移液器吸头，按照下表所示收集 6 份组分。将收集的组分放入 1.6ml 经标记的微量离心管中，保存于冰上。

    组分 1：紧靠第一个膜层之上的上层梯度液
    组分 2：在 1.2mol/L 蔗糖梯度层中的第一个膜条带
    组分 3：在第一个膜层（组分 2）和第二个膜层（组分 4）之间的蔗糖溶液
    组分 4：位于 1.2mol/L 和 1.5mol/L 蔗糖梯度溶液之间的膜条带
    组分 5：在两层梯度液的界面之下的 1.5mol/L 蔗糖溶液
    组分 6：膜沉淀

    囊泡膜存在于组分 1 和 2 中；高尔基膜主要存在于组分 2 中；ER 膜和质膜分别存在于组分 2（约 35%）和 4（约 65%）中

18. 在每份分离组分中加入冰冷的 HEPES/KAc 裂解液至约 1.4ml，混匀。按照要求处理分离的组分。

基本方案 4　应用 FICOLL 分级梯度液分离完整的囊泡

本方案将会从酵母原生质体提纯完整的、有功能的囊泡。

材料（带√项见附录 1）

实验所需的酵母菌
0.2×YPD（单元 1.6）
√PIPES/DTT 缓冲液
√草酰溶细胞酶缓冲液
草酰溶细胞酶（45 000 U/mg，Enzogenetics；0.5～1.0mg/每份分离组分）或是β-葡聚糖化酶（如酶解酶 100T；支持方案）
√15%、8%、4%和 0（w/v）Ficoll 溶液，4℃
√50×蛋白酶抑制剂的混合液（PIC）

√0.4mg/ml 葡萄糖溶液，新鲜制备

蛋白测定试剂盒（如 BioRad 或其他技术公司的，见附录 3B）

250ml 及 2L Erlenmeyer 培养瓶

30℃（或适于生长的温度）的摇床

离心机及转头，室温和 4℃（如 Beckman JA-20 和 JA-10 型转头或同类产品）

500ml 离心瓶（如与 Beckman JA-10 型转头或同类产品相配的）

10ml 玻璃吸管

30ml 玻璃 Corex 管（每份梯度液 1 管）或类似的玻璃离心管

30℃水浴箱

与 30ml 玻璃 Corex 管相配的套管（如 Beckman JA-20 型转头或同类产品）

异质同晶聚合物材质的离心管，预冷的（例如，与 SW41 Ti 型转头相配的14mm×89mm 管）

超速离心机及转头，4℃（如 Beckman SW41 Ti 或同类产品）

200μl 移液器吸头，吸头的尖端剪掉约 5～8mm

1.6ml 微量离心管

1. 在本实验开始前一天的早晨，开始预培养多份实验所需的酵母菌，即将其放入含 20mlYPD（或合适的培养基）的 250ml Erlenmeyer 培养瓶内孵育。在 30℃摇床内（或适于生长的温度）培养一整天，摇动频率为 225～350 r/min。

   如果与实验目的不冲突的话，可使用蛋白酶缺陷株以减少蛋白质降解（例如，TVY1、pep4 突变酵母菌株）。
2. 在本实验开始前一天的晚上，测定并记录各个预培养酵母菌的 OD_{600}。将适量体积的培养酵母菌与 1L 新鲜培养基孵育。
3. 在 30℃摇床内（或适于生长的温度）培养过夜，摇动频率为 225～325 r/min。
4. 在本实验开始的当天早晨，测定培养细胞的密度。选用 OD_{600} 值为 0.6～0.8 的培养物进行实验。
5. 室温，4000*g* 离心 5min，收集 OD_{600} 值为 0.6～0.8 的细胞，之后弃去上清液。用新鲜制备的 PIPES/DTT 缓冲液重新悬浮原生质体，使其浓度达约 15 OD_{600} 单位/ml（即每升初始培养物加 50ml 缓冲液）。
6. 混合或分装细胞悬液，按每份梯度液所需的量将其放入 500 ml 离心瓶中（即每份梯度液用一瓶细胞）。将细胞置于 30℃水浴箱内孵育 10min。室温，4000*g* 离心 5min，收集细胞。
7. 吸出上清液，在每份沉淀中加入草酰溶细胞酶缓冲液，使其浓度达约 40 OD_{600} 单位/ml（即每升初始培养物约加 15ml 缓冲液），用 10ml 玻璃吸管缓慢吹打重悬沉淀。将悬液从离心瓶移至多个已标记的 30ml 玻璃 Corex 管内（即每份梯度液一个管）。
8. 从每份悬液取出 10μl 并移至已标记的微量离心管中，以备步骤 10 使用。
9. 向管中添加草酰溶细胞酶（或 β-葡聚糖化酶），浓度达 1800～3600U/ml。置于 30℃（或允许的温度）水浴箱内孵育 25min。在草酰溶细胞酶消化过程中，制备新鲜的 0.4mg/ml 右旋糖酐溶液，在使用前一直保存于冰上。

10. 为了监测去除细胞壁的效果，用 990μl 水稀释 10μl 含草酰溶细胞酶的细胞悬液，短暂涡旋混匀，同样也稀释步骤 8 保留的 10μl 对照样品。静置 1～2 min 后，再次短暂涡旋混匀，并测定所有样品的 OD_{600}。继续在 30℃（或允许的温度）水浴箱内孵育，直到≥95％的细胞已经变为原生质体（≤60min）。
11. 将 30ml 玻璃 Corex 管置于有相应套管的 JA-20 型转头中。在 4℃条件下，先以 800*g* 的速度离心 1min，再以 1500*g* 的速度离心 1min，收集原生质体。
12. 可选用步骤：用约 15ml 草酰溶细胞酶缓冲液轻轻地重悬每份沉淀，清洗原生质体。重悬时用手轻缓地转动管，用玻璃棒轻轻地搅拌，切忌涡旋振荡。如步骤 11 所示，收集原生质体。
13. 小心地吸出上清液，将这些管保存于冰上。在 4℃条件下，向每管中添加 2.5ml 15％ Ficoll 溶液。用手轻缓地转动管，用玻璃棒轻轻地搅拌以重新悬浮原生质体。切忌涡旋振荡。
14. 向每管中添加 100～200μl 新鲜制备的 0.4mg/ml 的右旋糖酐溶液。立即混匀，用手轻缓地转动管，用玻璃棒轻轻地搅拌。切忌涡旋振荡。
15. 将这些管置于冰上 2min，使右旋糖酐结合于质膜上。将这些管放于 30℃水浴箱内 60～75s，然后立即置于冰上，这样可以破坏细胞膜。用相差显微镜检查细胞裂解液。不要重复热休克这一步。
16. 将细胞裂解液移至预冷的 14mm×89mm 异质同晶聚合物材质的离心管内，并保存于冰上。小心地将 3ml 8％ Ficoll 溶液、3.5ml 4％Ficoll 溶液铺于细胞裂解液之上。用 0％ Ficoll 溶液补差（即液面距管口约 5mm）。用 0％Ficoll 溶液平衡离心管，随后放入预冷的超速离心机转头中（如 Beckman SW41 Ti）。
17. 4℃，110 000*g* 离心 90min。采用缓慢加速及减速的设定。
18. 首先用开口修平的 200μl 移液器吸头小心地吸出含脂质的表面液层，并将其放入置于冰上的微量离心管中（或弃掉）。
19. 用开口修平的 200μl 移液器吸头，小心地吸出位于 0％Ficoll 溶液与 4％Ficoll 溶液层之间的含囊泡的组分，并将其放入置于冰上的微量离心管中。用相差显微镜检查细胞器的完整性和纯度。取 2μl 囊泡制备物与 10μl 15％Ficoll 溶液小心混匀，以备观察之用。
20. 每种囊泡制备物取 10μl，用 BioRad 蛋白测定试剂盒（或其他技术，见附录 3B）测定蛋白质的浓度。

   每份体积约为 600μl 的样品，其蛋白质浓度应约为 0.25～0.9mg/ml。用于功能测试的囊泡不能保存于冰上数小时。如果保存于 −80℃，用于体外“囊泡-囊泡融合”实验的囊泡样品可保持功能几周以上。

基本方案 5　应用 FICOLL 分级梯度液分离完整的细胞核

本方案是为从 6L 处于对数生长期的酵母培养物（即 3×10^{11} 个细胞）中提取细胞核而设计的，也可以按需要增大或减少。单倍体酵母菌 BJ2168，是囊泡蛋白酶活性缺失的缺陷株，其应用较广泛。BJ5465 是另一种蛋白酶缺陷株，也可获得好结果。

材料（带√项见附录 1）

实验所需的酵母菌
YPD 培养基（单元 1.6；或合适的培养基）
无菌水，冰冷的
√预处理缓冲液
√1.1mol/L 山梨醇溶液，冰冷的
蜗牛酶（NEN Life Science Products）
10mg/ml 酶解酶 100T（或是用 100 000U/g 酵母裂解酶；ICN）
√原生质体复苏培养基（可选用）
√1000×蛋白酶抑制剂的混合液 D（1000×PIC-D）
√1000×蛋白酶抑制剂的混合液 W（1000×PIC-W）
√Ficoll 铺垫溶液，4℃
20%、30%、40%和 50%（w/v）Ficoll 裂解液，含 1×PIC
√1×和 2×PM 缓冲液，4℃
√PSM 1 溶液
√TE/SDS 溶液（可选用）
30℃（或适于生长的温度）的摇床
250ml 及 2L Erlenmeyer 培养瓶
250ml 离心瓶
血细胞计数器
Sorvall GSA 型转头或同类产品；4℃预冷
1.6ml 微量离心管
30℃水浴箱
50ml 聚碳酸酯离心管（如 Oakridge 或同类产品）
水平型转头（如 Sorvall-HB4 型转头或同类产品），4℃预冷
匀浆器（如 Potter-Elvehjem 或 40ml 配有松弛型研磨棒的 Dounce 匀浆器），预冷的
Beckman 的 Ultra-clear 25 mm×89 mm 超速离心管（或同类产品），4℃预冷
Beckman SW28 型转头（或同类产品），2℃
20ml 注射器及 16G 针头

1. 在本实验开始前两天的早晨，预培养实验所需的酵母菌，即从新鲜的平板上挑取单个酵母集落，随后将其与 5ml YPD（或合适的培养基）共同孵育。在 30℃摇床内（或适于生长的温度）培养一整天，摇动频率为 225～350r/min。
2. 在本实验开始前两天的晚上，测定并记录培养酵母菌的 OD_{600}。将 5ml 预培养的酵母菌与 20ml 新鲜培养基孵育，接种于 250ml Erlenmeyer 培养瓶中，次日的早晨培养物能达到约 $1OD_{600}$。在 30℃（或适于生长的温度）摇床内培养过夜，摇动频率为 225～350r/min。

3. 在本实验开始的前一天早晨，测定培养细胞的OD_{600}。将20ml预培养物与50ml生长培养基孵育，接种于250ml Erlenmeyer培养瓶中，在下午晚些时候，培养物的OD_{600}能达到0.5～1.0。
4. 在本实验开始前一天的晚上，测定培养物的OD_{600}。预热六份1L的YPD至30℃。向每份1L YPD中加入50ml预培养物，使其在次日的早晨OD_{600}能达到约0.6～0.7。在30℃摇床内（或适于生长的温度）培养过夜，摇动频率为225～350r/min。
5. 在本实验开始的当日早晨测定1L培养物的OD_{600}。当OD_{600}达到约0.6～0.7时，收集细胞。
6. 将培养瓶放入冰水浴中，并不时晃动以冷却细胞。将其移入250ml离心瓶中，4℃，4000*g*离心5min，收集细胞。弃上清并将管置于冰上。用冰冷的水重悬沉淀，总体积达200ml。
7. 将细胞悬液移至一个已称过重量的250ml离心瓶中，4℃，4000*g*离心5min，倒出上清并吸出残留的上清液。测定细胞沉淀的湿重（约9g）。
8. 用新鲜制备的预处理缓冲液重新悬浮细胞沉淀，每克细胞沉淀湿重加4ml（例如，9g细胞沉淀中加入36ml的预处理缓冲液）。室温孵育10min，并不时地晃动。向其中加入冰冷的水至总体积为250ml，混匀。取出10μl放入微量离心管中，保存于冰上以备步骤10使用。
9. 4℃，4000*g*离心5min。
10. 在离心过程中，使用血细胞计数器测定细胞产量（即细胞数，通常为1.2×10^{10}～1.7×10^{10}个/g。可以用990μl水稀释10μl样品以便于计数）。
11. 用约200ml 1.1mol/L冰冷的山梨醇溶液重悬细胞。4℃，4000*g*离心5min。倒出上清并吸出残留的上清液。每1×10^{11}个细胞添加25ml 1.1mol/L山梨醇溶液（例如，细胞数为3×10^{11}就添加75ml 1.1mol/L山梨醇溶液）。用移液器将细胞打匀。
12. 取出100μl细胞悬液并移至微量离心管中，保存于冰上以备步骤14使用。
13. 为了消化细胞壁，可向每1×10^{11}个细胞悬液中加入1.5 ml蜗牛酶（生产商提供的浓度）和0.3ml 10mg/ml的酶解酶100T（例如，如果75ml 1.1mol/L山梨醇溶液中细胞数为3×10^{11}，就添加4.5 ml蜗牛酶和0.3ml* 10mg/ml的酶解酶100T）。用玻璃棒搅匀细胞悬液，将瓶盖拧松。在30℃水浴孵育1.5～2.5h，其间温和地搅拌。每15～20min在显微镜下（400倍）观察一次，监控消化程度。继续消化直到细胞变圆，成团细胞分开。
14. 为了监测去除细胞壁的效率，每种细胞悬液取10μl，用990μl水稀释，短暂涡旋混匀，同样也稀释步骤12保留的9.4μl对照样品。静置1～2 min后，再次短暂涡旋混匀，并测定样品的OD_{600}。
15. 在细胞壁消化过程和接下来的步骤中，如果时间允许，可以制备第一系列的Ficoll分级梯度液（见步骤26）。
16. 可选用步骤：如果细胞核将用于功能的研究，恢复性的孵育对保持最佳活性是有利的。将原生质体放在原生质体复苏培养基中，30℃孵育30min，其间温和地搅拌。

* 原文为0.3ml，译者认为是0.9ml；或者前面为0.1ml。此处为0.3ml——译者注

17. 将原生质体悬液分装至50ml 聚碳酸酯离心管中，每管加 1×10^{11} 个细胞。保存于冰上以冷却细胞。使用水平型转头，4℃，4000*g* 离心 5min。吸出上清液。
18. 用约 25ml 1.1mol/L 冰冷的山梨醇溶液轻轻地重悬每份细胞沉淀，用一根玻璃棒小心地搅拌悬浮沉淀。切忌涡旋振荡。使用水平型转头，4℃，4000*g* 离心 5min。吸出上清液。
19. 用约 20ml 1.1mol/L 冰冷的山梨醇溶液轻轻地重悬每份细胞沉淀。用一根玻璃棒小心地搅拌悬浮沉淀。切忌涡旋振荡。
20. 从 1000×PIC-D 和 1000×PIC-W 中各取 20μl 加入到 6ml Ficoll 垫层溶液中，涡旋振荡。使用巴斯德吸管或是带长针头或插管的注射器吸取 6ml Ficoll 垫层溶液，小心地将其铺于原生质体悬液之下。其余各管重复此步骤。
21. 4℃，4000*g* 离心 10min，使原生质体通过垫层溶液。吸出上清液，将湿的细胞沉淀保存于冰上。
22. 为了裂解原生质体，可向每份沉淀中加入 25ml 20% Ficoll 裂解液（室温）。用 25ml 移液器快速吹散沉淀。之后立即将悬液移入电动的 Potter-Elvehjem 匀浆机中，捣 5 次，用驱动装置带动研磨棒快速地旋转，以裂解细胞。
23. 立即将裂解液移入 50ml 聚碳酸酯离心管中，该管浸于冰内只露出管颈，应在 3～5 min内如此处理每份沉淀。裂解液浸于冰内 10～15min，用显微镜观察裂解情况（400 倍放大）。
24. 用预冷的水平型转头，2℃，13 000*g* 离心 5min。小心地将上清液移入新的、预冷的 50ml 聚碳酸酯离心管中，不要吸出松软的沉淀。2℃，以 13 000*g* 的速度将上清液离心 10min。
25. 不要移动上清液，将其保存于冰上直到步骤 30。
26. 在先前的步骤中，如果时间允许可以制备第一系列的 Ficoll 分级梯度液。将 50%、40%和 30%的 Ficoll 溶液加热至 25℃。从上述每种溶液中吸取约 20ml 移入新的 50ml 管中，并加入 PIC-D 和 PIC-W，涡旋振荡混匀。
27. 在天平上放置一个 25 mm×89 mm 的超速离心管和支持底座（每 1×10^{11} 个细胞需要一份梯度液）。减去上述物体的重量后，缓慢地向管底注入 6.5g 50% Ficoll 溶液。将第一管放于冰上冷却，重复处理其余各管。
28. 如步骤 27 所示，向每管注入 6.5g 40% Ficoll 溶液，放于冰上冷却。
29. 如步骤 27 所示，向每管注入 6.5g 30%Ficoll 溶液。梯度液在使用前要放于冰上 10 min以上以冷却。
30. 从每管中各吸取约 25ml（来自步骤 25）上清液铺在冷却的 Ficoll 梯度液上。不要吸出沉淀。
31. 如果需要，用 1×PM 缓冲液添满并平衡各管。2℃，58 400*g* 离心 60min。在离心的最后 30min 内，如步骤 27～29 所示制备第二系列 Ficoll 分级梯度液，但此时是用 5.5 g 的 Ficoll 溶液（对于 6L 的制备物，一般是制备两种梯度液）。使用前放于冰上要以上 10 min 以冷却。
32. 离心之后（步骤 31），检查梯度液并注意所有特征。
33. 用 20ml 注射器及 16G 针头收集细胞核。将针头插入紧贴 40%与 50%Ficoll 溶液界

面层之下的位置。针尖位于管的中央，针的斜面朝上，缓慢地向前向后移动针头并吸取约 8ml 液体。

34. 抽出针头并将收集的细胞核悬液排入 150ml 烧杯中，烧杯放于冰上冷却。如步骤 33～34 所示重复处理每份梯度液，并将收集的细胞核都放入上述 150ml 烧杯中。用一倍体积的冷的 1×PM 缓冲液稀释悬液，并用玻璃棒轻轻地搅拌。
35. 小心地将细胞核悬液铺于两个预冷的第二系列 Ficoll 分级梯度液面之上（步骤 31 中制备）。如果需要，加入 PIC 的 1×PM 缓冲液来添满并平衡各管。2℃，58 400*g* 离心 60min。
36. 离心后，如步骤 33 所示收集每份梯度液，约 10ml。将收集的细胞核合并放入 50ml 管中，置于冰上，用玻璃棒轻轻地搅拌。
37. 取出 50μl 细胞核制备物放入预冷的微量离心管中以备测定蛋白质浓度。保存于冰上直到步骤 39。
38. 用 10 倍体积的、加入 PIC 的冷的 1×PM 缓冲液稀释细胞核，以去除 Ficoll 溶液。用玻璃棒温和地搅拌使其混匀。4℃，10 000*g* 离心 10min 以沉淀细胞核。按照要求处理细胞核。
39. 用 10 倍体积的 PSM1 溶液稀释 50μl 收集的细胞核并混匀，测定蛋白质浓度。4℃，12 000*g* 离心 30min。用 50μl 水或 TE/SDS 溶液重新悬浮沉淀。用改良的 Lowry 法或 Bradford 实验测定蛋白质浓度（如附录 3B）。

基本方案 6　应用 NYCODENZ 分级梯度液分离乳糖诱导的线粒体

材料（带√项见附录 1）

D273-10B 细胞（或其他酵母菌株）
√半合成乳糖培养基
√TSD 还原缓冲液
酶解酶 20T（约 75mg）
缓冲液 A：1.2mol/L 山梨醇溶液/20mmol/L 磷酸钾，pH7.4（见磷酸缓冲液配方），室温
半合成乳糖培养基（见配方），添加了 1.2mol/L 山梨醇溶液（可选用）
200mmol/L 苯甲基氟化硫（PMSF，34.5mg/ml），溶于无水乙醇中；新鲜制备
缓冲液 B：0.6mol/L 山梨醇溶液/20mmol/L MES 钾盐（pH6.0），冰冷的
0.6%（w/v）SDS 溶液
√2×缓冲液 B
缓冲液 C：0.6mol/L 山梨醇溶液/20mmol/L HEPES 钾盐（pH7.4），冰冷的
√18%和 14.5%（w/v）Nycodenz 溶液，预冷的
100mg/ml 无脂肪酸的牛血清白蛋白（BSA）
200ml Erlenmeyer 培养瓶
30℃（或适于生长的温度）的摇床
Sorvall GS-3 转头（或同类产品）

250ml 离心瓶（如 Sorvall GS-3 转头或同类产品）
30℃水浴箱
1.6ml 微量离心管
40ml 和 1ml 配有紧密型研磨棒的 Dounce 匀浆器（或 Teflon 匀浆器），4℃
40ml 离心管（如与 Sorvall SS-34 转头相配的或同类产品）
Sorvall SS-34 转头（或同类产品）
清洁的超速离心管（如 Beckman SW-41 14mm×89mm Ultra-clear 离心管）
Beckman 超速离心机和 SW-41 转头（或同类产品）
剪过的 1ml 移液器吸头

1. 在本实验开始前两天的晚上，预培养 D273-10B 细胞（或其他所需的酵母菌），即将其接种于含 40ml 半合成乳糖培养基的 200ml Erlenmeyer 培养瓶内培养。在 30℃摇床内培养 24h，摇动频率为 225～325r/min。
2. 在本实验开始前一天的晚上，将 40ml 稳定期的预培养物接种于 4L 半合成乳糖培养基内（例如，每 10ml 预培养物用 1L 半合成乳糖培养基）。在 30℃摇床内过夜培养（约 15h），保持良好通气，直到测定培养物的 OD_{600} 达到 3 左右。
3. 在本实验开始的当天早晨，检测培养细胞的 OD_{600} 值。继续培养细胞直到测定培养物的 OD_{600} 达到 3 左右。室温，4000*g* 离心 5min 收集细胞，吸出上清液。
4. 用 120ml 无菌水悬浮细胞。将细胞悬液移至一个已称过重量的 250ml 离心瓶中。室温，2000*g* 离心 5min 以沉淀细胞。弃去上清液，称重，减去瓶子的重量以确定细胞沉淀的湿重。
5. 用新鲜制备的 40ml 还原缓冲液悬浮细胞。在 30℃水浴孵育 15min，其间缓缓地晃动。在孵育期间，称出所需酶解酶 20T 的量，每克细胞沉淀添加 2.5mg 酶解酶 20T。
6. 室温，2000*g* 离心 5min 沉淀细胞。弃去上清液。在缓冲液 A 中轻缓地重悬细胞沉淀，每克细胞沉淀添加 2ml 缓冲液 A（例如，30g 细胞沉淀用 60ml 缓冲液 A）。
7. 取出 10μl 细胞悬液移至 1.6ml 微量离心管中，保存于冰上以备步骤 9 使用。
8. 室温，2000*g* 离心 5min 沉淀细胞。在离心过程中，用缓冲液 A 溶解酶解酶 20T，其浓度达 1.25mg/ml。
9. 去上清液，用酶解酶溶液重新悬浮细胞沉淀。在 30℃水浴孵育 30min，其间温和地晃动。30min 后监测去除细胞壁的效率。用 990μl 水稀释 10μl 细胞悬液，短暂涡旋振荡混匀。同时稀释步骤 7 得到的 10μl 样品当作对照。静置 1～2min 后，再次短暂涡旋振荡，测定所有样品的 OD_{600}。继续孵育，直到≥95%的细胞已经变为原生质体。
10. 4℃，2000*g* 离心 5min（3500r/min，Sorvall GS-3），吸出上清液。
11. 用 30ml 缓冲液 A 轻缓地重新悬浮原生质体。4℃，2000*g* 离心 5min 以沉淀原生质体。
12. 可选用步骤：在 30℃条件下，用添加了 1.2mol/L 山梨醇溶液（终浓度）的半合成乳糖培养基洗原生质体 30～60min。轻轻地摇晃，沉淀原生质体（步骤 11）。

13. 将 0.5ml 200mmol/L PMSF 滴加到冰冷的 200ml 缓冲液 B 中并搅拌，以此方式制备缓冲液 B。经 Whatman 滤纸过滤后存于瓶中，置于冰上。
14. 用 40ml 含 PMSF 的冰冷的缓冲液 B 悬浮原生质体沉淀。将悬液分成两等份，置于冰上。将每份悬液移至 40ml 冰冷的 Dounce 匀浆器中，使用紧密型研磨棒上下反复搅动 15 次。将裂解液合并倒入在冰上预冷的烧杯中，向其中加含 PMSF 缓冲液 B 至终体积为 100ml。
15. 上清液移入 4 支 40ml 离心管内。4℃，1500*g* 离心 5min。小心地将上清液移入放在冰上预冷的烧杯中，小心避开松散的沉淀。将上清液置于冰上保存直到步骤 18。
16. 用 10ml 含 PMSF 的缓冲液 B 重新悬浮每份沉淀。将悬液合并倒入一支管内，晃动并混匀，随后将其分成两等份，每份 20ml。将每份悬液移至 40ml 玻璃 Dounce 匀浆器中，使用紧密型研磨棒上下反复搅动 15 次，其间不要产生气泡。
17. 将裂解液合并倒入一烧杯中，烧杯放在冰上。向其中加含 PMSF 的缓冲液 B 至终体积为 100ml。将裂解液移入 4 支 40ml 离心管内。4℃，1500*g* 离心 5min。
18. 将上清液移入储存有上清液（步骤 15）的烧杯中，小心避开松散的沉淀，弃掉沉淀。
19. 将上清液分装到 6 支 40ml 离心管内。4℃，12 000*g* 离心 10min。吸出上清液，用 7ml 冰冷的缓冲液 B（不含 PMSF）重悬每份沉淀，并将它们合并到 2 支管内。
20. 将每份悬液移至一干净的、预冷的 40ml Dounce 匀浆器中，使用紧密型研磨棒上下缓慢搅动 5～10 次（温和地，但要彻底）。将悬液分装到 2 支干净的 40ml 管内，4℃，1500*g* 离心 5min。
21. 将上清液分装到 2 支干净的 40ml 离心管内，避开松散的沉淀。4℃，12 000*g* 离心 10min。
22. 吸弃上清液，在 1ml 预冷的玻璃 Dounce 匀浆器或是 Teflon 匀浆器中，用 0.5ml 冰冷的缓冲液 B（不含 PMSF）温和地悬浮沉淀。将悬液移至 1.6ml 微量离心管中，保存于冰上。
23. 用 990μl 0.6% SDS 溶液稀释 10μl 粗提的线粒体悬液，测 A_{280} 以确定蛋白质浓度。将 10μl 缓冲液 B 与 990μl 0.6% SDS 溶液混合作为参比标准。

    在未稀释的悬液中，A_{280} 为 0.21 时所对应的蛋白质浓度约为 10 mg/ml。4L 培养物一般能产生 120mg 粗提的线粒体蛋白。
24. 使用微量离心机，将步骤 22 中产生的粗提的线粒体悬液离心，4℃，3000*g* 离心 5min，其目的是去除成团的物质。将悬液移至新的微量离心管中，保存于冰上。
25. 临用前，制备两份 Nycodenz 分级梯度液。将 5ml 18%预冷的 Nycodenz 溶液加入到每个干净的超速离心管内。小心地将 14.5%预冷的 Nycodenz 溶液铺于其上，注意要产生明显分层的界线。将梯度液保存于冰上。
26. 小心地将约 1ml 由步骤 24 产生的粗提线粒体（50～75mg 蛋白质）组分铺于每份梯度液之上。2℃，284 000*g* 离心 30min，采用缓慢加速及减速的设定。
27. 完成离心后，从转头的桶中小心地取出梯度液并将它们放于稳定的支架上。注意观察膜性团块的外观及其他特征。在收集每份梯度液时，将其他梯度液保存在 4℃，不要扰乱已有的分层。

28. 使用剪过的1ml移液器吸头先取出缓冲液层和大部分14.5%Nycodenz溶液层。同样用剪过的1ml移液器吸头取出线粒体层（18%/14.5%的界面），移入50ml管内，管是放在冰上的。
29. 将收集的线粒体合并，用15ml缓冲液C稀释。4℃，12 000g离心10min。弃掉上清液，在玻璃Dounce匀浆器或是Teflon匀浆器中，用0.5ml冰冷的缓冲液C（每份Nycodenz梯度液含0.25ml缓冲液C）温和地悬浮沉淀，以使线粒体彻底地被悬浮起来。将悬液移至微量离心管中，保存于冰上。
30. 为了测定近似的蛋白质浓度，可以用0.5ml缓冲液C稀释10μl步骤29中产生的经纯化的线粒体。4℃，12 000g离心3min。
31. 弃掉上清液，用1ml 0.6% SDS溶液重悬沉淀，并测定A_{280}。A_{280}为0.12，相当于在未稀释的悬液中蛋白质浓度约为10mg/ml。
32. 用冰冷的缓冲液C和添加了BSA的缓冲液C稀释线粒体，使其线粒体蛋白终浓度达25mg/ml，BSA的浓度达10mg/ml，这样可储存线粒体。将其等量分装冻于液氮中，再保存于－70℃或－80℃。在使用前，可在30℃水浴中快速融解，之后立即放于冰上。

基本方案7　用蔗糖分级梯度液分离油酸盐诱导的过氧化物酶体

材料（带√项见附录1）

√富生长培养基
酵母菌株D273-10B（或其他感兴趣的菌株）
√过氧化物酶体诱导培养基
√TSD还原缓冲液
√1.2mol/L山梨醇/磷酸溶液
100 000U/g酶解酶100T（ICN Biochemicals）
含1.2mol/L山梨醇的MES缓冲液（见配方），4℃
√MES缓冲液，4℃
0.65mol/L山梨醇/MES溶液（见配方），冰冷的
20%，30%，40%，44%，46%和60%（w/v）蔗糖/MES溶液：含超纯蔗糖的MES缓冲液（见配方），4℃
100ml和2L培养瓶
50ml离心管
250ml离心瓶
1.6ml微量离心管
Sorvall GS-3转头
离心机和Sorvall SS-34转头（或同类产品）
Dounce匀浆器，配有松弛型研磨棒（可选用），冷却的
Beckman异质同晶聚合物材质Quick-seal离心管（25mm×89mm）或同类产品
垂直型转头（Beckman VTi50或同类产品），4℃

30℃水浴箱

注射器及宽口径的针头

1. 在本实验开始的前三四天，从新鲜的平板上挑取单个酵母集落与 10ml 富生长培养基混合接种于 100ml 培养瓶内。28℃过夜培养细胞，并快速摇动。
2. 次日的早晨测定培养物的 OD_{600}。将预培养物接种于 10ml 富生长培养基（在新的 100ml 培养瓶内）直到测定培养物的 OD_{600} 达 0.15 左右。28℃培养细胞，并快速摇动。
3. 一旦培养物 OD_{600} 达 1.0～1.5，就接种于 10ml 富生长培养基（在新的 100ml 培养瓶内），直到测定培养物的 OD_{600} 达 0.010～0.015 左右（即按 1∶100 稀释）。在 28℃过夜培养细胞，并快速摇动。
4. 可选用步骤：重复步骤 2 和 3。
5. 在本实验开始前一天的早晨，测定 100ml 步骤 3 所得预培养物的 OD_{600}。接种于 300ml 富生长培养基中（在 2L 培养瓶内），测定培养物的 OD_{600} 达约 0.15。在 28℃培养细胞并快速摇动，直到培养物的 OD_{600} 达 1.0 左右。
6. 一旦培养物 OD_{600} 达 1.0，在室温下，以约 4000g 的速度离心 5min 沉淀细胞。弃去上清液，用 10ml 诱导培养基重悬细胞。将 5ml 细胞悬液移至含 1L 诱导培养基的培养瓶中。28℃过夜培养细胞，并快速摇动。
7. 在本实验开始的当天早晨（转移到诱导培养基后 12～18h），在室温条件下，4000g 离心 5min 收集细胞。吸出上清液，再用总量约 100ml 的无菌水重悬细胞。室温，4000g 离心 5min 以沉淀细胞。
8. 吸出上清液，再用总量约 40ml 无菌水悬浮细胞。将细胞悬液移至一个已称过重量的 50ml 离心管中。室温下，以约 4000g 的速度离心 5min 沉淀细胞。吸出上清液，吸去所有残留液，将含细胞沉淀的离心管称重，以确定细胞沉淀的湿重。
9. 用新鲜制备的 TSD 还原缓冲液重悬细胞，浓度为 0.125g/ml（即每克湿重细胞沉淀添加 8ml TSD 还原缓冲液）。30℃孵育 15min 并轻缓地摇动。室温，3000g 离心 5min 收集细胞。
10. 吸出上清液，用约 30ml 1.2mol/L 山梨醇/磷酸缓冲液重悬细胞。室温，3000g 离心 5min 收集细胞。吸出上清液，再用 1.2mol/L 山梨醇/磷酸缓冲液重悬细胞，使其浓度为 0.125g/ml。取出 10μl 细胞悬液并移至 1.6ml 微量离心管中，保存于冰上以备步骤 12 使用。
11. 向其中加入酶解酶 100T，使其终浓度为每克湿重细胞沉淀中含 1mg 酶。30℃培养 20min，并不时轻缓地搅拌。
12. 20min 后监测细胞壁消化程度。用 990μl 水稀释 10μl 细胞悬液，短暂涡旋振荡混匀。同时也将步骤 10 保存的 10μl 样品稀释后当作对照。静置 1～2min 后，再次涡旋振荡混匀，并测定所有样品的 OD_{600}。
13. 继续孵育，直到＞95％的细胞已经转变为原生质体，这通常需要 30～60min。室温，1000g 离心 5min 收集原生质体。
14. 弃上清，再用冰冷的 1.2mol/L 山梨醇/MES 缓冲液重悬沉淀，轻缓地晃动，用玻

璃棒搅拌以悬浮原生质体。切忌涡旋振荡，因为原生质体容易破碎。

15. 4℃，1000*g* 离心 5min 收集原生质体。将细胞悬液移至一个已称过重量的离心管中。重复步骤 14 和 15。
16. 可选用步骤：在 28～30℃下，用添加了山梨醇（终浓度为 1.2mol/L）的富生长培养基孵育原生质体 20～30min。轻轻地摇动。4℃，1000*g* 离心 5min 收集原生质体。
17. 重复步骤 14 和 15。
18. 吸出上清液，测定细胞沉淀的湿重。再用冰冷的 1.2mol/L 山梨醇/MES 缓冲液悬浮细胞，使其浓度为 0.125g/ml（即步骤 8 中测定的每克湿重细胞沉淀添加 8ml 缓冲液）。用玻璃棒搅拌以悬浮原生质体。切忌振荡。
19. 为产生低渗条件，向原生质体悬液中缓慢加入添加 PMSF 的冰冷的 MES 缓冲液，同时轻轻搅拌，直到山梨醇的终浓度为 0.6mol/L。在显微镜下检查细胞的裂解程度。
20. 4℃，2000*g* 离心 10min，去除未裂解的细胞及大的细胞团。取出上清液并移至新管中，保存于冰上直到步骤 22。
21. 用移液器吹打，以冰冷的含 PMSF 的 0.65mol/L 山梨醇/MES 溶液重悬沉淀，使其浓度达 0.125g/ml。4℃，2000*g* 离心 10min。
22. 将步骤 20 和 21 收集的上清液合并放入 50ml 离心管中，管在冰上预冷。4℃，20 000*g* 离心 30min，收集混合上清液中的过氧化物酶体（以及线粒体和其他细胞器）。
23. 离心 30min 后，吸去上清液。用玻璃棒或是广口的移液器，以 2ml 冰冷的 30%蔗糖/MES 溶液小心地悬浮细胞器沉淀，将细胞器悬液保存于冰上。
24. 利用标准方法测定细胞器悬液近似的蛋白质浓度（如附录 3B）。
25. 向细胞器悬液中添加冰冷的 30%蔗糖/MES 溶液，使其终浓度约为 5mg/ml。使用玻璃棒或是广口的移液器，小心地混匀。
26. 在使用前的 30min 或 30min 以内，在 Quick-seal 离心管中制备梯度液，依顺序加入 5ml 60%蔗糖/MES 溶液，12ml 46%蔗糖/MES 溶液，12ml 44%蔗糖/MES 溶液，5ml 40%蔗糖/MES 溶液。放于冰上冷却≥10min。
27. 向每份蔗糖分级梯度液中加入 2ml 来自步骤 25 的悬液。用冰冷的 20%蔗糖/MES 溶液填满并平衡各管，封好管口。使用垂直型转头（Beckman VTi50 或同类产品），4℃，34 500*g* 离心 2.5h，采用缓慢加速及减速的设定模式。
28. 完成离心后，小心地从转头的摆桶中取出梯度液并将它们放于稳定的支架上。注意观察膜性团块的外观及其他特征。在收集每份梯度液时，将其余梯度液保存在 4℃，不要扰乱已有的分层。
29. 使用注射器及宽口径的针头收集位于 60%/46%蔗糖溶液界面的过氧化物酶体。

基本方案 8　用蔗糖分级梯度液分离内质网

材料（带√项见附录 1）

实验所需的酵母菌（处于对数生长期的细胞，其量约为 5000 OD_{600}）

√HEPES 裂解液，4℃
√1mol/L DTT
√蛋白酶抑制剂储存液 B
√1.5mol/L 及 1.2mol/L 蔗糖/HEPES 溶液
250ml 离心瓶
机动的 Potter-Elvehjem 匀浆机（或玻璃 Dounce 匀浆器）
1.6ml 微量离心管
1.6ml 聚碳酸酯超速微量离心管，预冷的
Sorvall GS-3 转头
开口修平的 1ml 和 200μl 移液器吸头（吸头尖端剪掉约 5～10mm）
4ml Dounce 匀浆器，预冷的
Beckman Ultraclear 11 mm×34 mm 的离心管（或同类产品），预冷的
水平型转头（如 Beckman SW50.1 型转头或同类产品），4℃

1. 如支持方案步骤 1～3 所示，对实验所需的酵母菌进行培养（同见单元 1.6）。

   如果与实验目的不冲突的话，可使用蛋白酶缺陷株以减少蛋白质降解（例如，TVY614 是一个 pep4 prb1 prc1 突变酵母菌株）。
2. 在室温条件下，以约 4000*g* 的速度离心 5min 收集约为 5000 OD_{600} 单位的处于对数生长期中段的细胞。
3. 如支持方案步骤 4～11 所示，制备原生质体。
4. 用约 100ml 冷的终止液、原生质体培养基 B 或其他具有合适渗透压的溶液重新悬浮原生质体，使其浓度达 1～5OD_{600} 单位/ml。用手轻缓地转动管，用玻璃棒搅拌或用广口移液器缓慢吹打以悬浮原生质体。切忌涡旋振荡。将悬液保存于冰上以备下步使用。
5. 在 4℃条件下，以约 1500*g* 的速度离心 5min 收集原生质体，吸出上清液。用经添加 DTT 和蛋白酶抑制剂的冰冷的 HEPES 裂解液重新悬浮原生质体，其浓度达 1000 OD_{600} 单位/ml。
6. 使用机动的 Potter-Elvehjem 匀浆机制备裂解液（4～10 次）。保存裂解液于 4℃下。用相差显微镜检查 10μl 细胞裂解液。
7. 将上步的裂解液分配至多个冷的 1.6ml 微量离心管中。使用微量离心机，4℃，1000*g* 离心 10min，以去除未裂解的细胞、部分裂解的细胞及细胞团。
8. 小心地吸出上清液（S_{1000}），并移至新的冷却的管中，小心别碰到松软的沉淀（P_{1000}）。
9. 用约 2.5ml 的冰冷的 HEPES 裂解液悬浮 P_{1000}。重复匀浆及低速离心（步骤 6～7）。
10. 将第一份和第二份上清液 S_{1000} 合并（步骤 8 和 9），混合后将上述上清液（S_{1000}）移入聚碳酸酯离心管中，该管放于冰上冷却。
11. 在 4℃条件下，以 27 000*g* 的速度将 S_{1000} 离心 10min，吸出上清液（$S_{27\,000}$）。为了清除 $P_{27\,000}$ 沉淀上所有残留的上清液，将含有 $P_{27\,000}$ 样品的离心管于 4℃，13 000*g* 离心约 45s，小心地吸出残留液并弃掉。

12. 用 1.0ml HEPES 裂解液悬浮 $P_{27\,000}$（每毫升约 5000 OD_{600}）。再用 Dounce 匀浆器搅 5 次，以确保 $P_{13\,000}$ 沉淀完全散开。
13. 临用前制备 4 份蔗糖分级梯度液，以保持液层界面清晰。小心地吸取 1ml 1.5mol/L 蔗糖/HEPES 溶液并移至每支 11mm×34mm 的离心管中。用开口修平的 1ml 吸头吸取 1.2mol/L 蔗糖/HEPES 溶液铺于 1.5mol/L 蔗糖/HEPES 溶液之上。
14. 用开口修平的 200μl 吸头小心地将悬液 $P_{27\,000}$（步骤 12）铺于 4 份制备好的蔗糖梯度液之上（每份梯度液加 0.5ml）。如果需要，添加冰冷的裂解缓冲液，以平衡成对离心的梯度液。将添置好的梯度液放于水平型转头预冷的摆桶中（如 Beckman SW50.1 型转头或同类产品）。在 4℃条件下，以 100 000*g* 的速度离心 1h，采用缓慢加速及减速的设定以减少对所形成梯度的破坏。
15. 完成离心后，从摆桶中小心地取出梯度液并将它们放于稳定的支架上。对条带的位置和外观，以及任何其他明显的特征做好记录。
16. 收集位于 1.2mol/L 和 1.5mol/L 蔗糖溶液界面的内质网膜。首先移去加样层和大部分 1.2mol/L 蔗糖溶液层，然后收集位于界面的条带。
17. 用冰冷的 HEPES 裂解缓冲液将内质网膜悬液稀释 10 倍。4℃，27 000*g* 离心 10min，收集内质网膜。弃上清，按照要求处理沉淀分离组分。
18. 先用 1%（w/v）SDS 溶液悬浮少量制备物，再用 Lowry 法（附录 3B）测定蛋白质浓度（每 5000 OD_{600} 约有 7mg 蛋白质）。

基本方案 9　用蔗糖分级梯度液从完整的酵母细胞中分离质膜

材料（带√项见附录 1）

1L 实验所需的酵母菌培养物，处于对数生长期
√0.4、1.1、1.65、2.25mol/L 蔗糖/咪唑溶液，4℃
√ 蛋白酶抑制剂储存液
√裂解缓冲液，4℃
√质膜储存液（可选用）
250ml 离心瓶
50ml 聚碳酸酯离心管
√泡过酸的玻璃珠（直径 0.45mm），预冷至 4℃
Sorvall GS-3 转头
Sorvall SS-34 转头（或同类产品）及配套的离心管，4℃
Beckman 14mm×89mm Ultre-clear 离心管
Beckman SW41 或 SW40Ti 转头（或同类产品），4℃
Beckman Ti50 转头（或同类产品）

1. 制备 1L 处于对数生长期的实验所需酵母菌（见支持方案，步骤 1～3）。

如果与实验目的不冲突，可使用囊泡蛋白酶缺陷株以减少蛋白质降解（例如，*TVY1* 是一个 *pep4* 突变酵母菌株）。尤其是在使用热休克的细胞时。

2. 4℃，5000g 离心 5min 收集细胞。吸出上清液，再用 80ml 新鲜添加了蛋白酶抑制剂的 0.4mol/L 蔗糖/咪唑溶液悬浮细胞。
3. 将细胞悬液移入两个 50ml 聚碳酸酯离心管中。4℃，5000g 离心 10min 收集细胞。吸出上清液，在沉淀中加入 2 倍体积的预冷玻璃珠。加入冰冷的 0.4mol/L 蔗糖/咪唑溶液以覆盖住沉淀和玻璃珠。
4. 以最大速度涡旋振荡 5min。为保持裂解液处于低温，每振荡 30s，浸入冰水浴中 30～60s。显微镜下检查细胞裂解的程度。
5. 将管置于冰上约 2min，使玻璃珠沉降并使裂解液变冷。吸出上清液移至新的管中，保存于冰上。
6. 向玻璃珠中加入两倍体积冰冷的 0.4mol/L 蔗糖/咪唑溶液，振荡 30s。将管置于冰上使玻璃珠沉降。吸出上清液并和步骤 5 中的上清液混合。重复。
7. 4℃，530g 离心 5min，以去除未裂解的细胞、细胞膜碎片及细胞团。
8. 离心过程中，在 14mm×89mm Beckman Ultre-clear 离心管中制备两份蔗糖分级梯度液。吸取 4ml 2.25mol/L 蔗糖/咪唑溶液加入每个离心管中，再吸取 4ml 1.65mol/L 蔗糖/咪唑溶液铺于其上，最后铺上 4ml 1.1mol/L 蔗糖/咪唑溶液。使用前将蔗糖分级梯度液放于冰上冷却。
9. 将步骤 7 所得的上清液移入新的离心管中。4℃，22 000g 离心 30min，以收集含质膜的沉淀（也有细胞核、线粒体和囊泡）。
10. 小心地吸出上清液，并用 2ml 裂解缓冲液重新悬浮并以低速涡旋振荡 30s。
11. 小心地将含质膜悬液铺于制备好的两份蔗糖梯度液之上（步骤 8 中制备的）。用冰冷的裂解缓冲液平衡离心管，4℃，800 000g 离心 14h。
12. 离心完成后，从转头的摆桶中小心地取出梯度液并将它们放于稳定的支架上。注意观察膜性团块的外观及其他特征。在收集每份梯度液时，将其余梯度液保存在 4℃，不要扰乱已有的分层。
13. 使用巴斯德移液器收集位于 2.25mol/L /1.65mol/L 蔗糖/咪唑溶液界面的膜。用 4 倍体积的裂解缓冲液稀释并保存于冰上。
14. 将悬液移入新的离心管中，4℃，30 000g 离心 40min 使膜沉淀。吸去上清，用即将需要使用的缓冲液悬浮沉淀。
15. 可选择步骤：使用间接方法测定蛋白质浓度（附录 3B）。

基本方案 10　从完整的酵母细胞中分离细胞溶胶

材料（带√项见附录 1）

实验所需的酵母菌

YPD（单元 1.6 或适宜的生长培养基）

√PIPES 裂解缓冲液，预冷的

√50×蛋白酶抑制剂的混合液（50×PIC）或同类产品

√酸洗的玻璃珠（直径约 0.45mm；BDH 或 Sigma），预冷至 4℃

亚甲基蓝

BioRad 蛋白测定试剂盒（或同类产品）
250ml 及 2L Erlenmeyer 培养瓶
摇床，30℃（或有助于该菌种生长的适宜温度）
离心机转头（如 BeckmanJA-20 和 JA-10 型转头或同类产品）
500ml 离心瓶
30ml 玻璃 Corex 管（每份细胞溶胶用一个管），预冷的
冰水浴
与 30ml 玻璃 Corex 管相配的套管（适于 Beckman JA-20 型转头或同类产品的）
超速离心管，4℃
超速离心机转头（BeckmanTLA 100.2 型转头或同类产品）
台式超速离心机，4℃
微量离心管，预冷的

1. 在本实验开始前一天的早晨，预培养实验所需的酵母菌，将酵母菌与 20ml YPD（或合适的培养基）置于 250ml 培养瓶内共同孵育。在 30℃摇床内（或适于生长的温度）培养一整天，摇动频率为 225～335r/min。

   如果与实验目的不冲突的话，可使用囊泡蛋白酶缺陷株以减少蛋白质降解（例如，TVY1 是 pep4 突变酵母菌株）。最好是从新鲜的平板上挑取单个的酵母集落。

2. 在本实验开始前一天的晚上，测定并记录预培养物的 OD_{600}。准备两份 1L YPD（在 2L Erlenmeyer 培养瓶中），向每份中加入适当体积的预培养物。在 30℃摇床内（或适于生长的温度）培养过夜，摇动频率为 225～325r/min。次日早晨测定细胞密度。
3. 用 500ml 离心瓶，室温，4400g 离心 5min，以收集 2000 OD_{600} 的细胞，之后倒出或吸弃上清液。
4. 用 50ml 预冷的 PIPES 裂解缓冲液重新悬浮沉淀（约每 2000 OD_{600} 的细胞沉淀用 50ml 缓冲液）。将细胞移至小一些的离心管内，以最大速度涡旋振荡 15s。将细胞悬液移至另一个 500ml 离心瓶中。
5. 在室温条件下以 4400g 的速度（例如，用 JA-10 型转头，5000r/min）离心 5min 收集洗过的细胞，之后吸去或弃掉上清液。用 2ml 预冷的 PIPES 裂解缓冲液重新悬浮沉淀（每 2000 OD_{600} 的细胞沉淀用 2ml 缓冲液）。每 2ml 悬液中加入 80μl 50×PIC，涡旋振荡混合。
6. 将细胞悬液移至一预冷的、做好标记的 30ml 玻璃 Corex 管（每 2000 OD_{600} 单位的悬液加一个管），加入 3g 预冷的酸洗的玻璃珠。用封口膜封好管口，将管置于冰水浴中 2min。以最大速度涡旋振荡 30s，随即置于冰水浴中 1min。每管重复 15 遍。
7. 用相差显微镜检查细胞裂解程度。以 90μl PIPES 裂解缓冲液稀释 10μl 细胞悬液，加入约 5μl 亚甲基蓝并混匀。观察裂解物以确定染色细胞的百分比。
8. 4℃，3000g 离心 10min，以去除未裂解的细胞、细胞膜碎片及细胞团。小心地将上清液移至预冷的超速离心管中（每管约 1.2ml），如果需要，加冰冷的裂解缓冲液来平衡。
9. 4℃，150 000g 离心 1h。小心地吸弃每份样品表层的脂层。小心地将上清液移入预

冷的微量离心管中，不要吸出沉淀。

10. 用 BioRad 蛋白测定试剂盒（或同类产品；见附录 3B）测定每份细胞溶胶的蛋白质浓度（通常为 10～30mg/ml）。用水制备多管细胞溶胶稀释液（例如，1∶10～1∶100；总量 10μl）。

互联网资源

http://www.proteome.com/

http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/

http://www.atcc.org/searchengine/ygsc.html

http://www.proteome.com/

参考文献：Walworth et al.，1989；Zinser and Daum，1995

撰稿人：Stephanie E. Rieder and Scott D. Emr

（熊伟鹏　陈实平　译）

第4章　细胞生物学研究的工具——抗体

单克隆抗体和多克隆抗体是解答细胞生物学问题的有力工具。这些免疫学试剂可用于检测和分析蛋白质和碳水化合物、研究蛋白质的亚细胞分布状况以及纯化蛋白质。此外，如果抗体进入细胞，就可作为标签来监视蛋白质的细胞内通路、抑制蛋白质的活性。抗体分子的分子遗传学及三维结构的研究进展，推动了抗体技术在这些不同领域的应用。检测抗体结合活性及分离抗体方法的发展，也为抗体的广泛应用及扩大其应用范围做出了贡献。

单克隆抗体的出现大大推进了抗体在细胞生物学研究领域的应用，它已成为检测特异蛋白质与抗原决定簇之间相互作用的唯一的、有力的试剂。这类抗体来自杂交瘤细胞，而杂交瘤细胞通过免疫B细胞与肿瘤细胞融合产生。每一种杂交瘤只分泌一种类型的抗体——单克隆抗体，它有高度的特异性并常常有高亲和力（单元4.1）。由于克隆化的杂交瘤细胞系是永生的，只要适当地培养就可不断地维持，它所产生的抗体实际上是无限的。含有单克隆抗体的制备物包括杂交瘤的培养上清、接种了杂交瘤的小鼠腹水及纯化的单克隆抗体。单元4.1描述了如何制备单克隆抗体，包括免疫、细胞融合、杂交瘤筛选的基本步骤。

制备多克隆抗体（单元4.2）比制备单克隆抗体简单，制备程序仅仅包括用纯化的抗原免疫一种动物（包括山羊、马、大鼠、小鼠、兔子在内的任意一种），在动物产生免疫反应后，从其血清中分离抗体。由于多克隆抗体实际上是具有不同抗原决定簇特异性及亲和力的各种单克隆抗体的集合体，因此它们对于分析变性的蛋白质、免疫沉淀、免疫印迹是很有用的。在这些类型的实验中，用单克隆抗体常常失败，因为单克隆抗体所识别的单个结合位点在蛋白质变性过程中可能被破坏了。

选择何种动物用于免疫，部分取决于后续实验所需的血清量。相对于兔子等其他个体较大的动物，小鼠、大鼠和豚鼠产生的血清量较低，因此兔子是最常选用的动物。然而用其他动物生产多克隆抗体也是常有的，特别是当一种实验需要两种不同类型抗体识别不同的蛋白质时（这种情况常出现在间接免疫荧光分析中）。单元4.2有免疫动物产生多克隆抗体的详细步骤，同时也讨论了抗体反应的动力学、何时冲击免疫、不同佐剂的使用等问题，如何生产高滴度抗体的研究进展也包含于其中。应用这些技术，研究者能够在6～8周内得到多克隆抗体并用于实验。

当需要了解抗体的准确浓度时，纯抗体的制备就显得至关重要。例如，在进行抗体结合的研究而对抗体进行化学修饰或结构修饰的时候。单元4.3阐述了如何制备纯的单克隆抗体及多克隆抗体。此单元对各种纯化方法进行了讨论，包括硫酸铵沉淀、蛋白A和蛋白G亲和层析、离子交换层析以及这些方法的联合使用等。此单元还介绍了测定抗体活性的快速分析法，以确保提纯过程中抗体的活性没有丧失，同时也对用于抗体纯

化和裂解的商品试剂盒的可靠性及价格进行了讨论，这些试剂盒适合于不能自行制备抗体的研究者。

单元 4.4 描述了如何将抗体与荧光染料和生物素相连接，已证实这种直接标记的抗体对于同时测定一个样品中的多种结构或功能是必需的。单元 4.4 还描述了几种简单的方法，可直接标记抗体又可以保持抗体的活性。一种基本方法是在抗体上引出一个氨基与染料或生物素结合，这种方法便于操作，并且具有很高的成功率。

撰稿人：Jennifer Lippincott-Schwartz

单元 4.1　单克隆抗体的制备

将免疫 B 细胞与肿瘤细胞融合而产生杂交瘤细胞，每个杂交瘤细胞只分泌一种抗体，通过杂交瘤细胞可获得高度特异性的抗体。单克隆抗体具有高度特异性并可大量生产，因此这些生物试剂已被广泛用作探针应用于各个研究领域，包括鉴定新型的细胞表面、可溶性蛋白、碳水化合物（如酶的催化剂）以及靶向免疫治疗。

注意：所有与活细胞接触的溶液、器具必须灭菌，要依照无菌操作技术来操作。如果没有特殊要求，所有培养箱都是保持潮湿、37℃、5% CO_2 的环境。

注意：所有使用活体动物的方案都必须预先进行审核并得到动物使用及保护委员会（IACUC）的批准，必须执行政府有关实验室动物保护及使用的规定。

基本方案 1　制备单克隆抗体的免疫方法

各式各样的抗原都已成功地用于产生单克隆抗体。

警告：CFA 是一种很强的烧灼剂，对于研究者是有危险的，特别是如果进入皮肤或眼睛，可能导致深度的皮肤脱落或视力丧失。自我注射可以使 TB 皮肤试验呈阳性，导致肉芽肿的反应。取 CFA 时要戴手套和防护眼镜。

材料

抗原：细胞、蛋白质或肽
无血清培养基
盐水
完全弗式佐剂（CFA，Sigma）
年轻、成熟（>6 个月）、无病原体的动物：小鼠（BALB/c 首选用于免疫产生大脾）、大鼠或地鼠（推荐用亚美尼亚地鼠；Cytogen Research）
不完全弗式佐剂（IFA，Sigma），可选择
1～2ml 带 Luer-Lok tip 的玻璃注射器
三通阀门
20G 针头

1a. 适用于细胞抗原：通过抗体-形成分析（Donoven and Brown　1995）来筛选细胞用

于病原体研究。用无血清培养基洗 3 遍，每只动物用 $2\times10^6\sim5\times10^7$ 个细胞溶于生理盐水作为抗原（通常用小鼠最容易操作）。

1b. 适用于蛋白质或肽抗原：每只动物用 1～50μg 蛋白质或肽抗原，溶于生理盐水。

2. 将抗原吸入一个无菌的 1～2ml 带 Luer-Lok tip 的玻璃注射器中，将注射器与一个三通阀门相连。
3. 搅动沉淀在容器底部的微细菌肺结核杆菌，将 CFA 彻底混匀。用一个玻璃注射器吸取与抗原体积相同的 CFA，再与含抗原的注射器相连。
4. 制备抗原与 CFA 的乳化液，将抗原推入 CFA，再推回来，如此反复直至混合物黏稠。检测乳化液是否稳定（即滴一滴在水面上不会散开），将所有乳化液转入一个注射器中，去掉另一个注射器和三通阀门，在有乳化液的注射器上安上一个 20G 的针头。
5. 将乳化液腹腔注射至健康、年轻、成熟的动物：针头穿过皮肤使皮肤与腹壁之间形成通道，在离皮肤穿刺点一定距离的点插入腹腔；每只小鼠注射小于 0.2ml，每只大鼠注射 0.5～1ml（通常要麻醉），每只地鼠注射 0.2～0.4ml；要小心避免拔出针头时产生的压力太大，退出前要转动针头以减少渗漏。
6. 10～14 天后用大致相同的抗原量加强免疫。如果计划在加强免疫后 3 天进行细胞融合，免疫时抗原单独用水溶液溶解或用完整细胞制成悬液；如果不准备马上进行细胞融合，就将抗原与 IFA 制成乳化液，对动物进行加强免疫。
7. 如果需要，可在初次免疫或加强免疫后第 7～10 天，用 ELISA 或免疫沉淀法测定抗体效价。

基本方案 2　细胞融合与杂交瘤细胞的选择

筛选分析方法（见支持方案 1）已建立之后才能进行细胞融合，因为本单元的这个方案必须只用 100μl 完成筛选工作，在细胞融合之前必须能够鉴别出人为的结果，这些结果可能来自条件培养基，而融合之后只有很少的时间可用于分析所需要的单克隆抗体。

注意：所有试剂和培养基都必须在融合前一天准备好。

材料（带√项见附录 1）

具有药物标志的 SP2/0-Ag14 骨髓瘤细胞系，非分泌型（ATCC＃CRL. 1581），小鼠脾细胞融合需要 1×10^8，地鼠脾细胞融合需要 2×10^8，大鼠脾细胞融合需要$5\times10^8\sim10\times10^8$。

DMEM-10 和 DMEM-20 完全培养基，含 10mmol/L HEPES 和 1mmol/L 丙酮酸钠

预先准备好的动物（初次免疫后 10～14 天静脉注射；见基本方案 1）

√DMEM 完全培养基，无血清

√50％PEG

√氯化铵溶液

√DMEM-10/20 完全培养基，含 10mmol/L HEPES，1mmol/L 丙酮酸钠，1×HAT

或 1×HT 添加物。

弯头镊子或尖头解剖剪

细网眼金属筛

50ml 锥底塑料离心管

Beckman TH-4 转头或同类产品

96 孔平底微孔板

1. 融合前 1 周，用 DMEM-10/HEPES/丙酮酸钠完全培养基扩增非分泌型、具有药物标志的 SP2/0-Ag14 骨髓瘤细胞系（融合的对象）。
2. 融合前 3 天，将预先准备好的动物加强免疫（见基本方案 1，步骤 7）。
3. 融合前 1 天，将 SP2/0-Ag14 骨髓瘤细胞（步骤 1）用新鲜 DMEM-10/HEPES/丙酮酸钠完全培养基分离培养，促进细胞旺盛生长以获得好的融合效果。用倒置显微镜确认 SP2/0-Ag14 骨髓瘤细胞正处于旺盛生长期（细胞透亮、饱满），无污染（未见细菌或真菌），细胞数量足以进行细胞融合，如果没有达到这些要求就延期进行细胞融合。
4. 在 37℃水浴中，用 400～600ml 的烧杯预热 3 杯 100ml 水，20ml 无血清 DMEM 完全培养基，5ml 无菌的 50%PEG 溶液。
5. 以 CO_2 窒息或断颈的方法处死加强免疫的小鼠，在无菌条件下收集脾脏：小鼠或地鼠取两个脾脏，大鼠取一个脾脏。将脾脏转移至一个直径 100mm 的培养皿中，加入 10ml 无血清 DMEM 完全培养基。所有的后继工作都在超净台中进行。
6. 用弯头镊子挤压脾脏或用尖头解剖剪刀剪碎脾脏，制成单细胞悬液。将细胞悬液用细网眼金属筛过滤，去除碎片并进一步使细胞分散。将脾细胞悬液转移至 50ml 锥底塑料离心管中，加入无血清 DMEM 完全培养基，在室温条件下，用 Beckman TH-4 转头，500*g* 离心 5min，弃上清。
7. 用 5ml 氯化铵溶液重新悬浮沉淀，室温放置 5min，溶解红细胞（RBC）。加入 45ml 无菌的无血清 DMEM 完全培养基，离心（如步骤 6）。重复一次加 DMEM、离心的步骤（每重复一次，就是清洗一次）。
8. 清洗脾细胞的同时，将培养的 SP2/0-Ag14 骨髓瘤细胞（步骤 3）转入 50ml 锥底离心管，分离收集细胞。重复步骤 6，用 DMEM 重悬骨髓瘤细胞，收集所有细胞放入一个 50ml 锥底离心管中。按步骤 7 清洗骨髓瘤细胞 3 遍。
9. 用 10ml 无血清 DMEM 完全培养基重悬脾细胞和骨髓瘤细胞。计数及评价细胞生存能力（单元 1.1），两种细胞悬液的存活率都应接近 100%。根据细胞的数量，计算加入 DMEM-20/HEPES/丙酮酸钠完全培养基的量，使接种细胞浓度为 16.1×10^6 个/ml。将这些细胞悬液放在 37℃水浴中预温。
10. 取 96 孔平底培养板，连续编号：一块板需要最终调好的两种细胞悬液各 10ml。
11. 将 SP2/0-Ag14 骨髓瘤细胞与脾细胞按 1：1 的比例（也用其他比例，低到 1：20 也可）混合于 50ml 锥底离心管中，管中加满无血清 DMEM 完全培养基，在室温条件下 500*g* 离心 5min。
12. 在细胞离心的同时，准备 3 个 37℃的双层烧杯水浴放在超净台中：取一个 400ml 的

烧杯（步骤 5）装入 100ml 37℃的温水，再放在一个 600ml 装有 75～100ml 37℃温水的烧杯中。将一管预温的 50%PEG 溶液和一管无血清 DMEM 完全培养基（步骤 5）放到超净台里的两个 37℃水浴中。

13. 混合的细胞离心沉降后吸去上清，将此离心管置于层流超净台内的另一个双层烧杯水浴中，在 37℃进行细胞融合：用一个 1ml 的移液管吸取 1ml 预热的 50%PEG 溶液，逐滴加入混合细胞团中，1min 加完，每加一滴，用移液管的尖端搅拌细胞团，加完后再搅拌 1min。用一个干净的移液管取 1ml 预热的无血清 DMEM 完全培养基逐滴加入细胞混合团中，1min 加完，每加一滴都要搅拌一下，重复一次。用一个 10ml 的吸管，吸取 7ml 预热的无血清 DMEM 完全培养基逐滴加入，2～3min 加完。
14. 在室温条件下 500g 离心 5min。离心过程中，将烧杯水浴放在 37℃复温并放在超净台中，将预热的 DMEM-20/HEPES/丙酮酸钠完全培养基（步骤 9）放在烧杯水浴中。
15. 弃上清，将离心管放在烧杯中水浴，用一个干净的 10ml 移液管，取 10ml DMEM-20/ HEPES/丙酮酸钠完全培养基使劲冲向细胞沉淀表面，重复此步骤，将所有预热的 DMEM-20/HEPES 完全培养基加入。如果需要，可让细胞团沉降，用移液管尖端将其打散。如果总体积超过 50ml，轻轻吸取细胞悬液并转移至一个无菌容器如培养瓶中。此时的细胞悬液不再需要进一步温育。
16. 可选用的步骤：在接种至 96 孔板之前，将细胞融合后的细胞悬液接种至培养瓶中过夜，使成纤维细胞贴壁，此步骤可以减少成纤维细胞的过度生长。
17. 用一根 10ml 装有吸头的移液管（不是重复使用的微量加样器），轻轻吸取 10ml 细胞悬液，手持移液管，在孔的上方 1～2cm 处呈 45°角的位置，用另一个手的手指撑住，向 96 孔平底培养板的每一个孔加入两滴（100 至 125μl）细胞悬液，一直加完所有的悬液。孵育过夜，在倒置显微镜下检查每个孔，如果接种的细胞数量合适，就可看到在孔底有单层基本汇合的高活力的细胞以及细胞团。
18. 用 10ml 移液管在每个孔中加入 2 滴 DMEM-20/HEPES/丙酮酸钠/HAT 完全培养基（见步骤 17），每块板单独用一根吸管，盖子不要盖错，重新放在温箱中，每日检查。

19a. 对于大面积污染的板：丢弃大面积污染的板。

19b. 对于只有一两个孔污染的板：在真空条件下吸去孔内溶液，用 70%乙醇清洗，棉签擦拭，乙醇洗 2 次后用棉签擦干，在盖的相对区域用浸泡过 70%乙醇的棉签擦拭。

有其他板在超净台内时，不要打开污染的板。

20. 于第 2、3、4、5、7、9、11 天（这个日程表只有前面 4 天是严格的），在真空条件下吸去一半液体，手持吸管以 45°角用吸管的顶端靠着上清液的表面，插入点就是液体和孔壁的界面，每块板单独用一根吸管。再用一根 10ml 的吸管，每孔中加入 2 滴 DMEM-20 /HEPES/丙酮酸钠/HAT 完全培养基，重新放回温箱。每日检查板，即使不按日程表来换液，如果发现孔内培养基变酸了（即变黄），就要为细胞换液。

21. 到了第 14 天，重复换液的操作，但培养基改为 DMEM-20/HEPES/丙酮酸钠/HT 完全培养基，再放回温箱培养。第 15 天以后，注意改用不含 HAT 或 HT 的 DMEM-20/HEPES/丙酮酸钠完全培养基换液（如果要进行 H^3 胸腺嘧啶核苷结合分析试验，至少要换 3 或 4 次）。
22. 筛选上清（见支持方案 1）。

支持方案 1　筛选原始杂交瘤上清

大多数的孔不含所要的抗体或可能含有非分泌的杂交瘤。筛选的目的是发现那些含有能够分泌所需特异性抗体的孔（<1%～5%），注意这些抗体还不是单克隆性的。在倒置显微镜下观察，当大部分孔的细胞生长达到 10%～25%汇合度，或一些细胞密集的孔在换液后两天内就变黄的时候，就要进行筛选。一般在小鼠-小鼠或大鼠-小鼠细胞融合后的第 10～14 天，或地鼠-小鼠融合后的第 14～21 天可以达到这个要求。尽管细胞密度很高的孔可以先筛选，而密度低的可以等到密度高时再筛选，但这样需要双倍的工作，不推荐使用这种方法。

材料（带√项见附录 1）

生长中的杂交瘤细胞（见基本方案 2）
√DMEM-20/10mmol/L HEPES 培养基

1. 在倒置显微镜下观察，估计有杂交瘤细胞生长的孔的数量，确定是将所有孔筛选一遍，还是只筛选那些有杂交瘤生长的孔。
2. 让存活孔中的杂交瘤细胞在培养箱中生长，不换液的时间多于 2 天，从每个需要检测的孔中吸取 100μl 用于筛选分析，如 ELISA 或间接免疫荧光法。一块板收集完，下一块板收集之前，每个孔中加入新鲜的 DMEM-20/ HEPES 培养基（见基本方案 2，步骤 20）。

支持方案 2　杂交瘤细胞系的建立

选出 20 个最好的杂交瘤细胞孔（见支持方案 1），扩增、换液，反复这样做，冻存并用有限稀释法进行克隆化培养（见支持方案 3），所有 20 个都要冻存，并建立有限稀释的板，同时检测上清。

材料（带√项见附录 1）

生长中的杂交瘤细胞（见基本方案 2）
√DMEM-20/10mmol/L HEPES/1mmol/L 丙酮酸钠培养基
克隆化/扩增培养基（见支持方案 4）
24 孔微量滴定板

1. 当 96 孔板中杂交瘤细胞生长至 25%～50%汇合度（或孔中如混有成纤维细胞时要尽早进行），用无菌的吸管将主孔内的细胞重悬（微量加样器调至 100μl 很方便，如果

有成纤维细胞就不要刮孔底）。将主孔中的所有细胞都转移至24孔板中的一个孔中，用1ml的吸管往主孔中加入3滴DMEM-20/10mmol/L HEPES/1mmol/L丙酮酸钠完全培养基（见基本方案2，步骤20），放入培养箱中。

2. 用1～1.5ml克隆化/扩增培养基培养24孔板中的细胞，每个孔用新的吸头和不同瓶子里的培养基，培养2～3天。
3. 当24孔板中的细胞生长至25%～50%汇合时（2～3天），用有限稀释法进行克隆化培养（见支持方案3），如果有必要，再重复步骤1和2。
4. 取细胞进行有限稀释克隆化培养之后，将24孔板中剩余的细胞转移到一个4ml无菌的带盖试管中。
5. 将试管中的细胞于室温下500*g*离心5min。保留上清液用于进一步鉴定抗体的特性及作为对照，将细胞沉淀冻存（单元1.1）。
6. 如果有限稀释的板没有产生一个能生产抗体的细胞系，复苏细胞，种回24孔板，重复此方案。

支持方案3　用有限稀释法进行克隆化培养

与软琼脂技术不同，用有限稀释法进行克隆化培养，可直接检测培养上清。

附加材料（同见基本方案2）

候选的杂交瘤细胞系（见支持方案2，步骤4）
克隆化/扩增培养基（见支持方案4）

1. 在相应孔中重新悬浮候选的杂交瘤细胞系（见支持方案2，步骤4），取少量（50μl）细胞悬液计数，估计细胞存活率（单元1.1），用克隆化/扩增培养基制备每毫升含50个、5个活细胞的悬液各10ml，接种至96孔板，每孔200μl，孵育7～10天。
2. 通过确定有杂交瘤生长的孔的数量来证实哪种稀释液适合于单克隆的生长，如果按每孔1个细胞来接种，有“生长”的孔，说明合适，否则就按每孔10个细胞来接种。
3. 在给细胞换液之前，用倒置显微镜检查孔的单克隆性，找到单个紧抱的细胞团证明是单克隆生长；如果有一个以上的细胞团，表明是多克隆生长，尽可能不要用这些孔。
4. 在第7～10天，以最初用于检测主孔的筛选方法来检测单克隆孔中目的抗体的活性。取一定量最初的杂交瘤上清（见支持方案2，步骤5）作为阳性对照。如果有的孔开始变黄，最好检测它们，需要的克隆被确认之后，扩增并冻存这个孔的细胞，方法如原代杂交瘤细胞（见支持方案2）。
5. 将阳性杂交瘤克隆中的一个再克隆一次，如步骤1和2，接种两块新的96孔板，每孔0.3个细胞（60个活细胞悬浮于40ml克隆化培养基中），重复步骤3和4，扩增并冻存再克隆的杂交瘤细胞（见支持方案2）。
6. 再克隆的细胞换成DMEM-10/HEPES/丙酮酸钠完全培养基培养，每天按1∶2的比

例分离细胞，用 DMEM-10/ HEPES/丙酮酸钠完全培养基培养 3 天（有些细胞可能需要先用 DMEM-15 培养）。至此，所需要的杂交瘤细胞就成为稳定的细胞系了。

7. 在不同时间、用不同量的冻存液（单元 1.1）冻存多管。取一些有代表性的管复苏，检查细胞的生长状况，并用适宜的方法检测上清液中 MAb 的活性（见支持方案 1）。
8. 如果需要，用杂交瘤生产腹水，或大量生产收集杂交瘤的培养上清，用来鉴定 MAb 的类型。

支持方案 4　制备克隆化/扩增培养基

不含细胞、经过无菌过滤的悬浮液上清能够提高杂交瘤细胞的克隆形成率。除了可选择用饲养细胞以及胸腺细胞条件培养基外，也可选用白介素-6（浆细胞生长因子），如脂多糖刺激性的 $P388D_1$ 培养上清。

附加材料（见基本方案 1 和 2）

75cm² 培养瓶
0.45μm 的滤器

1. 处死 5 或 6 只 4～6 周的无病原体（即经过支原体污染检查）的小鼠（如 BALB/c），不要使用麻醉剂。无菌取出胸腺，撕碎，制成单细胞悬液（见基本方案 2，步骤 6），用 20ml DMEM-20/HEPES/丙酮酸钠完全培养基重新悬浮细胞。
2. 将 10ml 胸腺细胞放入 75cm² 培养瓶中，加入 DMEM-20/ HEPES/丙酮酸钠完全培养基，最终量达到每个胸腺 20ml（每个培养瓶最多放 60ml 细胞悬液），竖立放置温育 4～5 天。
3. 将细胞悬液转移至一个无菌的 50ml 锥底离心管中，在室温条件下 1000*g* 离心 5min，收集上清，用 0.45μm 的滤器过滤上清，每 10ml 一管，冻存于－20℃。用时溶解，以 10%～20%终浓度加至所需培养基中。

参考文献：Gooding，1996；Oi and Herzenberg，1980
撰稿人：Wayne M.，Yokoyama

单元 4.2　多克隆抗体的制备

注意：*所有使用活体动物的方案都必须预先进行审核并得到动物使用及保护委员会（IACUC）的批准，必须执行政府有关实验室动物保护及使用的规定。*

基本方案　用弗式佐剂免疫产生多克隆抗体

警告：*CFA 是一种很强的烧灼剂，特别是如果进入皮肤或眼睛，可能导致深部皮肤脱落或丧失视力。自注射可以使 TB 皮肤试验呈阳性，导致肉芽肿的反应。取 CFA*

时要戴手套和防护眼罩。

材料

无病原的动物：兔子（新西兰红或新西兰白为首选）、大鼠、小鼠或地鼠
弗式完全佐剂（CFA；Sigma）
1～2mg/ml 纯化的蛋白抗原溶于 PBS（见 PBS 的配方）
弗式不完全佐剂（IFA；Sigma）
3ml 的玻璃注射器，配有 19G、21G 和 22G 针头
双向锁芯连接器（Luer-Lok，Becton Dickinson）或塑料三通活塞

1. 在免疫之前将无病原动物先放一些血作为阴性对照，将血样收集在 50ml 离心管中。用血制备血清，分析，储存（见支持方案 1）。如果有必要，可以用完全无关的抗原免疫动物获取免疫血清，或将多只纯净动物的血清合在一起作为阴性对照。
2. 振摇 CFA 使不溶解的微细菌结核杆菌分散，取 2ml CFA 加至 2ml 纯化的蛋白抗原中，蛋白质的浓度为 0.25～0.5mg/ml，溶于 PBS（抗原用量可能要根据经验来确定），保存在 4℃。要制备足够免疫 4 只兔子或 80 只小鼠的免疫原（制备时不要用 Tris 系统的缓冲液）。
3. 用 19G 针头将 CFA 与抗原的混合物吸入一个 3ml 玻璃注射器中，去掉针头，尽量排出多余的空气。将注射器与一个双向锁芯连接器或塑料三通活塞（图 4.2.1）相连，另一端接一个空的 3ml 玻璃注射器，将混合物从一个注射器推向另一个注射器，如此反复，尽可能使温度保持在 4℃（即放在冰上）。当混合物变成白色均匀的悬液时，拔掉连接器或活塞，安一个 21G 的针头，用 100ml 烧杯盛 50ml 凉水，在其表面滴一滴乳化液，以此检查乳化液是否稳定。好的油-水乳化液滴在水面应能保持滴状，如果分散开，就要用中心相连的注射器继续混匀直至形成合格的乳化液。

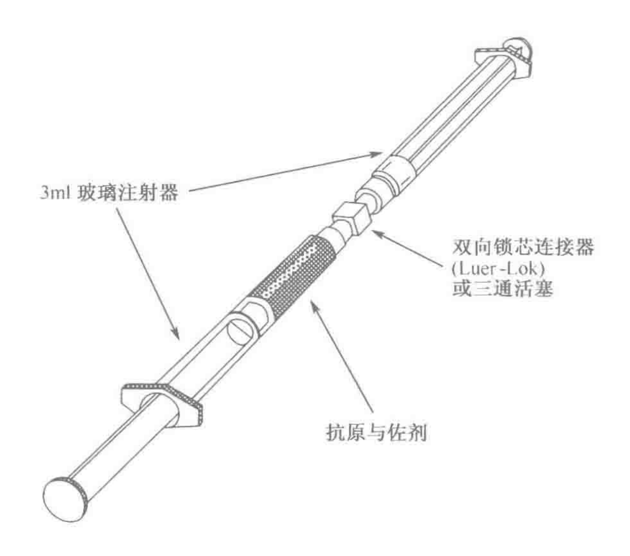


图 4.2.1　用于制备抗原-佐剂乳化液的双注射器装置

4. 将所有佐剂-抗原乳化液转移至注射器中，去掉连接器或活塞，安一个 22G 的针头，除去气泡。抓住动物，多点注射佐剂-抗原乳化液：肌肉注射（兔子：注射三条腿，每条腿 300μl，或腰部肌肉每边注射 500μl）、皮内注射（每个点最多 50μl）或皮下注射（每个点 100μl）；如果是小的啮齿动物（即小鼠），采用腹膜内注射。未用的免疫原通常要丢弃，对于非常贵重的抗原，可以存放于 4℃数周，用前重新乳化（蛋白质抗原可能会发生变性）。
5. 初次免疫之后 10～14 天，取血，收集血样，制备血清（见支持方案 1）。
6. 制备抗原用于加强免疫，按照步骤 2～4 操作，如果初次免疫用的是 CFA，后继的免疫都是以 IFA 作为佐剂。
7. 初次免疫之后 4～8 周（可以早至 2 周）进行第一次加强免疫，之后 10～14 天取血，收集血样，制备血清（见支持方案 1）。
8. 间隔 2～3 周，进行进一步加强免疫，但要避免重复皮内注射（如果兔子最初采用皮内或皮下注射，此时最好采用肌肉注射）。每次加强免疫之后 10～14 天取血，收集血样，制备血清（见支持方案 1）。

备择方案　用其他佐剂免疫产生多克隆抗血清

如果使用 TiterMax，未用完的抗原/佐剂乳化液可储存于 4℃、－20℃或－70℃很长时间，抗原仍然稳定，但用前可能需要重新乳化。对于所有抗原都没有必要用 TiterMax 进行加强免疫，如果必须进行第二次免疫，就用可溶性抗原代替抗原/佐剂乳化液，于第 4 周进行。如果 10～14 天之后效价仍然很低，立即进行一次抗原/TiterMax 佐剂的加强剂量免疫，增加抗原的量可能也有帮助。

如果使用 Ribi 佐剂系统（RAS），未用完的抗原/佐剂乳化液可储存于 4℃数月，然而如果最初不需要使用全部抗原，最好单独用盐水重新分装为 1ml，储存于 4℃，需要的时候，按 1∶1 的比例与溶于盐水的抗原混合。Ribi ImmunoChen 不推荐 RAS 佐剂/抗原加强注射频繁进行，每 4 周以上进行一次即可。

附加材料（同见基本方案）

TiterMax ＃R-1（CytRx；4℃储存少于 24 个月）或 Ribi 佐剂系统（RAS，Ribi ImmunoChe；储存于 2～8℃，不要冻存）
1ml 塑料注射器

1a. 使用 TiterMax：将抗原与 TiterMax 佐剂等量混合乳化，除了抗原用量和佐剂用量是 0.5ml，乳化时用塑料注射器之外，其他操作如前述（见基本方案，步骤 2 和 3）。
1b. 使用 Ribi 佐剂系统：将装有 RAS 的小管于 40～45℃温育 5～10min，直接用安有 21G 针头的塑料注射器将 2ml 溶于 PBS 的抗原推进小管中（2ml 终体积中含 2％鲨烯油），盖的周边用封条封上，室温条件下涡旋振荡 3min。
2. 将抗原乳化液转移至 1ml 注射器中，安一个 22G 的针头，去除气泡。
3. 固定动物，注射抗原/佐剂乳化液。如果以 TiterMax 为佐剂免疫兔子，每只大腿肌

肉注射 40μl 含 30～50μg 抗原；如果以 RAS 为佐剂免疫兔子，多点注射 1ml 含 50～250μg 的抗原：皮内（id）注射 6 个点，每个点 0.05ml；每个后腿肌肉注射 0.3ml；颈部皮下注射 0.1ml。

4. 取动物血样，制备抗原用于加强免疫（见基本方案，步骤 5 和 6）。于第 4、8 和 12 周进行加强免疫，每次加强免疫后 10～14 天取血，从血液制备血清（见支持方案），产生抗原特异性高滴度血清后就可停止免疫。

支持方案 血清的制备

附加材料（同见基本方案）

血样（见基本方案）
Sorvall H-1000B 转头或同类产品

1. 将血液置于 50ml 离心管中，室温放置 4h，形成血块，然后置于 4℃放置过夜使血块回缩。如果没有形成血块，最初可在离心管中放入一个木制的棒，重复这一步骤。
2. 用木棒轻轻将血块从管壁分离（不要弄破血块），移去血块。
3. 将血清转移至 50ml 离心管中，用 Sorvall H-1000B 转头离心，2700*g*、4℃离心 10min，除去所有残余的血细胞及碎片。
4. 用适宜的方法测定血清滴度：免疫沉淀（单元 8.5）、免疫印迹（单元 7.7）、ELISA 或琼脂免疫双扩散分析。
5. 将血清等量分装于带螺口盖的离心管中，－20℃可储存 6 个月以上（有些血清反复冻融会使活性下降），如果要长期储存于 4℃，则加入 0.02%的叠氮钠。

参考文献：Hariow and Lane，1988
撰稿人：Helen M. Cooper and Yvonne Paterson

单元 4.3 免疫球蛋白 G 的纯化

如果需要了解抗体的准确浓度、对抗体进行化学修饰（例如，用荧光素、放射活性探针标记抗体用于抗体结合的研究）或对抗体进行结构修饰［例如，去掉 Fc 段产生双价的 F（ab'）2 或单价的片段］，就必须使用纯化后的抗体。

基本方案 1 硫酸铵沉淀和分子筛层析

此法可用于纯化各种 IgM，IgG，IgA。

材料（带√项见附录 1）

腹水或单抗培养上清
√PBS

√饱和硫酸铵（SAS）
√硼酸缓冲盐（可选用）
超细葡聚糖 S-200（Amersham Pharmacia Biotech）
√含 0.02%叠氮钠的 PBS（可选用）
玻璃纤维（Polysciences）
硅胶离心管和 SS-34 转头（或同类产品）
26×900mm 柱（Amersham Pharmacia Biotech）

1a. 适用于腹水：首先去除腹水（5～10ml）中的油脂，即在漏斗中垫上足量的玻璃纤维（取时戴手套），将腹水加入，加完后用 PBS 淋洗玻璃纤维，最后用戴手套的手挤压玻璃纤维以获得所有样品；在 4℃或室温条件下，将过滤后的腹水于 20 000 *g* 离心 30min，轻轻倒出并保存这些上清，丢弃沉淀中的膜物质和细胞碎片。
1b. 适用于培养上清：在 4℃或室温条件下，将 100ml 单抗培养上清于 20 000 *g* 离心 30min，轻轻倒出并保存这些上清。
2. 将 SAS 慢慢加入腹水或组织培养上清液中，边加边搅拌，加至 45%（v/v）。在 4℃放置 1～2h 或过夜，以确保所有蛋白质都已沉淀。在 4℃或室温条件下，20 000 *g* 离心 1h。保留沉淀用于步骤 4，保留上清用于检查抗体的活性。
3. 用少量 PBS 或硼酸缓冲盐溶液溶解沉淀（10～20ml 通常比较合适），将溶解的沉淀装入透析袋中（没必要用预先煮过的透析袋，因为是一个精确的 MWCO*）。在 4℃用 PBS 或硼酸缓冲液透析 24～48h，中间更换 4～6 次，总体积大于 20 倍体积（附录 3C）。将蛋白质溶液浓缩至 5ml 以下（附录 3C）。
4. 制备一个 26mm×900mm 的聚丙烯酰胺葡聚糖（Sephacry）S-200 Superfine 柱，加入浓缩的蛋白质（5～100mg 的抗体量是最适宜的结果），用 PBS、PBS/0.02%叠氮钠或碳酸缓冲盐溶液淋洗柱子，淋洗速度不要超过 0.5ml/min，收集 100 份（柱体积的 1%）。如果使用的不是预先校准的柱子，需用紫外分光光度计，波长 280nm 检测监控。
5. 对 A_{280} 数值大于 0.5 的组分进行非还原和还原 10%聚丙烯酰胺电泳（单元 7.1），检查抗体的纯度，确定 IgG 的存在（表 4.3.1）。
6. 用分光光度法测定 IgG 的浓度，将含有纯 IgG 的洗脱液收集在一起，以硼酸缓冲盐溶液或 PBS/0.02%叠氮钠（w/v）调节 IgG 的浓度至 0.1～30mg/ml，储存于 4℃可达几年以上。对于备份冻存的管，应冻存于－70℃（只能冻融一次），不要将抗体储存于－20℃一个月以上，不要反复冻融。

基本方案 2　蛋白 A 葡聚糖亲和层析

蛋白 A 可用于分离腹水、血清及组织培养和生物反应器上清中的单克隆或多克隆

* 译者注：MWCO 为 molecular weight cutoff 的缩写，可译为“分子质量截留”

IgG。蛋白 A 适合于纯化人（除了 IgG3；与小鼠 IgG1 可能结合得弱一些）、兔子、豚鼠及猪的抗体（见表 8.5.1）。

材料（带√项见附录 1）

腹水或 MAb 上清
PBS，pH8.0
1mol/L NaOH（可选用）
蛋白 A-葡聚糖 CL-4B，水溶的（Amersham Pharmacia Biotech 或 Sigma）
0.1mol/L 柠檬酸，根据抗体亚类调节 pH（见步骤 5）
2mol/L Tris 缓冲液（Bochringer-Mannheim）
√PBS，pH7.3，不含或含 0.02%叠氮钠
√硼酸缓冲盐溶液（可选用）
3mol/L 硫氰酸钾，已过滤
Sorvall 离心机及 SS-34 转头（或同类产品）
0.45μm 滤器
HiTrap 蛋白 A 柱子（Amersham Pharmacia Biotech 或 Sigma；可选用）
1.5cm×10cm 柱子（如 10ml 注射器）
玻璃纤维
收集器
蠕动泵（可选用）

用于腹水的纯化

1a. 澄清腹水，去除油脂（见基本方案 1，步骤 1a）
2a. 将腹水用 PBS（pH8.0）稀释 10 倍。

用于 MAb 上清的纯化

1b. 将 MAb 上清离心，20 000 *g*，4℃，用 0.45μm 的滤器过滤。
2b. 以 pH 8.0 的 PBS（附录 3C）透析 MAb 上清或加入 1mol/L NaOH 来调节 MAb 上清至 pH 8.0（这对于分离 IgG1 很重要，其他类型的抗体应该调节在 pH7.4）。
3. 用 HiTrap 蛋白 A 柱，或制备一个 1.5cm×10cm 的水溶性蛋白 A-葡聚糖 CL-4B 树脂柱（每毫升可结合 5mg 的小鼠 IgG，8mg 的人 IgG），加入树脂之前，在柱子的底部加入玻璃纤维（戴手套），加树脂。将柱子与一个收集器相连，在 4℃或室温条件下用 PBS（pH8.0）洗柱子。将抗体溶液（1ml～1L）加在柱床上，量大时用一个蠕动泵或靠重力沉降。
4. 用几倍体积的 PBS（pH8.0）洗柱子，直到洗出液的 A_{280} 出现一个基线，洗脱速度都是 1ml/min。
5. 以相应 pH 的 0.1mol/L 柠檬酸洗脱抗体（用 1mol/L NaOH 调节至适宜的 pH，

pH6.5适合于小鼠IgG1，pH4.5适合于IgG2a，pH3.0适合于IgG2b和IgG3)。如果考虑到低pH对抗体的危害，可在收集器的试管中预先加入2mol/L的Tris缓冲液（Boehringer Mannhein)，每毫升洗脱液加50μl。对样品采用反向洗脱（样品的抗体量不超过柱子的总结合能力）可以达到较高的浓度，用流式细胞计数分析或ELISA方法来评定抗体的活性。

6. 合并含蛋白质的洗脱组分，将其置于透析袋中，在4℃条件下用1L的PBS（pH 7.3）透析，PBS中可加也可不加0.02%叠氮化钠（附录3C)，换两次透析液。以PBS或碳酸缓冲盐溶液保存样品，储存于4℃。如果需要，用SDS-PAGE检查抗体的纯度。
7. 用一个柱体积的3mol/L硫氰酸钾（已过滤）清洗柱子，再用PBS（pH 7.3）重新平衡柱子，储存于4℃。

备择方案1　蛋白G葡聚糖亲和层析

蛋白G葡聚糖亲和层析柱对于从血清、腹水、组织培养上清和生物反应器的上清纯化抗体是很有用的，这种方法可用于纯化小鼠IgG1，大鼠（除了IgG2b，大部分亚类的结合较弱)、猴子、兔子、牛、山羊、马和绵羊的抗体。

附加材料（同见基本方案2）

0.1mol/L乙酸钠，pH5.0
0.1mol/L甘氨酸-HCl，pH2.8
HiTrap蛋白G柱子（Amersham Pharmacia Biotech或Sigma）

1. 制备腹水或MAb上清（见基本方案2，步骤1a或1b）
2. 用0.1mol/L乙酸钠（pH5.0）稀释样品，组织培养上清可稀释2倍以上，腹水和生物反应器培养上清以10倍稀释。
3. 用0.1mol/L乙酸钠（pH5.0）平衡HiTrap蛋白G柱子（每毫升树脂能结合10mg蛋白)，将抗体溶液加在蛋白G凝胶上，用几个柱体积的0.1mol/L乙酸钠（pH5.0）洗柱子，用0.1mol/L甘氨酸-HCl（pH2.8）洗脱结合的抗体，如果考虑低pH会使抗体降解，可在收集器的每个试管中加入2mol/L的Tris缓冲液，每毫升洗脱液加50μl。
4. 合并含蛋白质的组分，透析（附录3C)。
5. 用0.1mol/L甘氨酸-HCl（pH2.8）洗柱子，使柱子再生，然后再用0.1mol/L乙酸钠（pH5.0）重新平衡柱子。

备择方案2　抗大鼠κ链单克隆抗体结合的葡聚糖亲和层析

有时，某种单克隆抗体（特别是由大鼠产生的）既不能用蛋白A也不能用蛋白G葡聚糖亲和层析来纯化，这时可用结合有抗大鼠Ig轻链单克隆抗体的葡聚糖亲和层析

柱来纯化组织培养上清或腹水中的单克隆抗体。

附加材料（同见基本方案 2）

小鼠抗大鼠 κ 链单克隆抗体：用蛋白 A 葡聚糖纯化过的 MaR18.5（ATCC ＃TIP 216）（见基本方案 2）

CNBr-Sepharose CL-4B（Amersham Pharmacia Biotech）

结合缓冲液：0.05mol/L Tris·Cl、0.15mol/L NaCl、0.02%（w/v）NaN_3，pH8.6

需要纯化的粗制大鼠抗体溶液（MAb 上清或腹水）

pH7.0 洗脱缓冲液：0.05mol/L 磷酸钠、0.15mol/L NaCl、0.02%（w/v）NaN_3，pH7.0

pH5.5 洗脱缓冲液：0.05mol/L 柠檬酸钠、0.15mol/L NaCl、0.02%（w/v）NaN_3，pH5.5

pH4.3 洗脱缓冲液：0.5mol/L 乙酸钠、0.15mol/L NaCl、0.02%（w/v）NaN_3，pH4.3

pH2.3 洗脱缓冲液：0.5mol/L 甘氨酸、0.15mol/L NaCl、0.02%（w/v）NaN_3，pH2.3

1. 将 10mg 以上纯化的 MAR18.5 单克隆抗体与 CNBr-Sepharose CL-4B 共价结合，比例为每毫升湿胶加 10mg 左右 MAR，这样的柱子具有 1mg 蛋白质的结合能力。
2. 制备柱子，在 4℃或室温条件下用结合缓冲液充分洗柱子。
3. 澄清腹水或 MAb 上清（见基本方案 2，步骤 1a 至 2b）。
4. 将粗制的大鼠抗体溶液——10ml 腹水或 100ml MAb 上清加在柱子上，以 10～15 个柱体积的结合缓冲液充分洗柱子，检测 A_{280} 以确认吸光值回落到基线，从步骤 5 和 6 开始，用一个部分收集器收集所有的组分。
5. 先用 5 个柱体积、pH7.0 的洗脱缓冲液洗脱（预洗），再用 5 个柱体积、pH5.5 的洗脱缓冲液洗脱（洗脱出一些抗体），然后用 5 个柱体积、pH4.3 的洗脱缓冲液洗脱（洗脱下大部分抗体），最后用 5 个柱体积、pH2.3 的洗脱缓冲液洗脱（洗脱出所有剩余的抗体）。整个洗脱过程用紫外监测器监控，在 A_{280} 回落到基线之前，不要更换缓冲液。
6. 用 10 个柱体积以上的结合缓冲液平衡柱子，封口膜封口，存放于 4℃。
7. 鉴别洗脱的蛋白峰（包括未结合的初始组分），合并洗脱液，进行抗体活性分析，如果需要，还要测定浓度（见基本方案 1，步骤 6）。

基本方案 3　以 Tris·Cl 为缓冲液的 DE52 离子交换层析

DE52 离子交换层析可用于提纯组织培养上清、腹水及血清中的抗体，或者提纯由这些含抗体的液体所制备的硫酸铵沉淀物。本方案也可作为分子筛（SE）层析（见基本方案 1 及备择方案 1 和 2）之后的第二个步骤。不同的单克隆抗体以及来自不同免疫动物血清的抗体组分要在不同的条件下从 DE52 柱子上洗脱下来，注意要摸索这些条件。

材料（带√项见附录 1）

DE52 干粉（Whatman）
√0.01mol/L Tris·Cl，pH8.6
√0.5mol/L NaCl、0.01mol/L Tris·Cl，pH8.6
抗体样品（腹水、组织培养上清、免疫血清或硫酸铵沉淀物）
1.5cm×50cm 柱子

1. 将 DE52 干粉泡在 0.01mol/L Tris·Cl 中，pH8.6（确认 pH 已调节），去掉细的颗粒。倒入一个 1.5cm×50cm 的柱子中（每毫升水溶胶可结合 100mg 以上的总蛋白），用 0.01mol/L Tris·Cl 平衡柱子，pH8.6（用前即刻检查）。
2. 将抗体样品装入透析管中，用≥20 倍样品体积的 0.01mol/L Tris·Cl 透析两次，pH8.6，4℃过夜（附录 3C）。
3. 将透析过的抗体样品加在柱子上层，用 0.01mol/L Tris·Cl 洗柱子，pH8.6（用前即刻检查），一直洗到在此 pH 条件下不能结合到柱上的所有蛋白质都已通过柱子，可用紫外检测仪检测 A_{280} 来确认（有些抗体可能会洗掉，但绝大多数能吸附在柱子上）。收集前 10 个管的组分（每管 12ml）。
4. 用 200～250ml 0.01mol/L Tris·Cl（pH8.6）与等体积的 0.5mol/L NaCl、0.01mol/L Tris·Cl（pH8.6）组成的线性梯度洗脱液洗脱吸附在柱子上的物质（用前即时检查 pH 值）。收集组分，每管 2ml，对这些组分做下列指标的检测：①A_{280}，测定蛋白质的浓度；②传导率，观察随蛋白质浓度变化而发生的梯度变化；③抗体活性，用 ELISA 检测；④蛋白质结构，用 SDS-PAGE 检测（单元 7.1）。在 SDS-PAGE 确认之后，保存所有组分。

参考文献：Hardy，1986；Harlow and Lane，1988；Pierce，1995；Pharmacia，1994
撰稿人：Sarah M. Andrew and Julie A. Titus

单元 4.4　抗体缀合物用于细胞生物学研究

基本方案　抗体与荧光团或生物素的结合

材料（带√项见附录 1）

纯化的抗体
√1.0mol/L 碳酸钠
√磷酸缓冲盐溶液（PBS）
探针：荧光团（表 4.4.1 和表 4.4.2）或生物素
二甲基甲酰胺或二甲基亚砜（DMSO）
√1.5mol/L 羟胺，pH8.0
√反应缓冲液，pH7.5

分子筛层析介质：MATREX Cellufine GH25（Amicon/Millipore），BioGel P30（BioRad Laboratories），或同类产品

ToyoPearl HW-40F（Tosohaas）

BSA 或明胶（可选用）

TLC 溶剂（表 4.4.1；只有在标记荧光染料时使用）

10 mmol/L 4′-羟基偶氮苯-2-羧酸（HABA），溶于 10mmol/L NaOH（用于生物素标记）

0.5mg/ml 抗生物素蛋白，溶于分析缓冲液（用于生物素标记）

分析缓冲液：50mmol/L 磷酸钠/150mmol/L NaCl，pH6.0（用于生物素标记）

0.25mmol/L 生物素溶于分析缓冲液（用于生物素标记）

旋转柱子：Ultrafrel 离心过滤装置，Biomax-50K 或-100K（Amicon/Millipore；可选用）

大小适宜的层析柱（见步骤 6）

TLC 硅胶/铝板（EM Science）和专用小室（只用于荧光染料标记）

1a. 冻干的抗体：用 0.1mol/L 碳酸钠（可将 1mol/L 储存液稀释 10 倍而获得）溶解纯化的抗体，5～10mg/ml 或尽量浓。如果与异硫氰酸酯荧光团或磺酰氯荧光团结合，将碳酸溶液的 pH 调至 9.0。

1b. 抗体溶液：如果抗体溶于 PBS，可加入 1/10 体积的 1mol/L 碳酸钠达到适宜的 pH，碳酸钠的 pH 可调至 9.0 或不调。如果抗体溶解于含胺（或含硫酸铵）的缓冲液，就要用 PBS 或 0.1mol/L 碳酸盐缓冲液透析而排除，因为探针能够与任何可利用的自由胺起反应。

2. 计算探针（荧光团或生物素，10mg/ml）与被标记抗体起反应所需的体积：10mg/ml 的探针的毫升数＝｛［（抗体的毫克数）/（10mg/ml 的探针）］/（抗体的分子质量）｝×（探针与抗体孵育的分子比×探针的分子质量），在这里每个抗体分子上探针的适宜数量取决于探针的反应性以及抗体的浓度和结构（表 4.4.1）。如果可能，可用三种不同摩尔浓度进行孵育反应。

   通常一个 10～20kDa 的蛋白质，如果每个蛋白质分子的赖氨酸 ε-氨基上只标记一个探针分子，则可以保持它的活性。因此，每分子 IgG 抗体上可能可以标记 4～8 个较小的、亲水性探针分子（如荧光素、生物素、磺胺染料），或 2～4 个疏水性探针分子，如罗丹明。标记 Fab 片段时，必须用较小的分子比，要比表 4.4.1 所推荐的用于天然抗体的标记比例小。

3. 立即进行反应前的准备工作：配制 10mg/ml 的探针溶液，用精密天平称适量探针（如 3mg），溶解于 0.3ml 无水 DMF 中［磺胺氯得克萨斯红（Texas Red sulfonyl chloride）和磺胺氯丽丝胺罗丹明 B（Lissamine rhodamine B sulfonyl chloride）总是用此溶剂］或 DMSO 中，将反应的探针置于涡旋器或超声振荡器上振荡，直至完全溶解，一般不要储存反应的探针，除非储存于－20℃时反应性丢失在可承受的范围之内。

表 4.4.1 几种常用的荧光团的 TLC 溶剂以及推荐的探针与抗体孵育的分子比[a]

荧光素	MR(抗体浓度为 1～3mg/ml)	MR(抗体浓度为 4～10mg/ml)	MW/Da	探针 /(mg/ml)	TLC 溶剂
Alexa 荧光体350	15～25	10～15	410	10	H_2O : AcCN=20 : 80
Alexa 荧光体430	15～20	8～10	623	10	H_2O : AcCN=20 : 80
Alexa 荧光体488	20～25	15～20	643	10	H_2O : AcCN=20 : 80
Alexa 荧光体532	14～18	10～12	724	10	H_2O : AcCN=20 : 80
Alexa 荧光体546	12～15	8～10	1079	10	H_2O : AcCN=20 : 80
Alexa 荧光体568	25～30	10～20	792	10	H_2O : AcCN=20 : 80
Alexa 荧光体594	20～30	10～20	819	10	H_2O : AcCN=20 : 80
BODIPY FL	15～30	10～15	641	10	C : M : A=70 : 25 : 5
喀斯喀特蓝 (Cascade Blue)	15～20	10～15	607	10	D : H_2O : P : NH_4= 50 : 16 : 19 : 15
Cy3双 SE	15～28	5～15	944	10	C : M : A=70 : 25 : 5
Cy5单 SE	10～20	5～10	792	10	C : M : A=70 : 25 : 5
曙红	50～70	40～60	705	10	C : M : A=70 : 25 : 5
FITC	40～60	30～60	389	10	C : M : A=70 : 25 : 5
荧光素-EX	20～25	15～20	590	10	C : M : A=70 : 25 : 5
玛丽娜蓝(Marina Blue)	8～12	6～10	367	10	C : M : A=70 : 25 : 5
俄勒冈绿488	15～20	10～15	509	10	C : M : A=70 : 25 : 5
俄勒冈绿514	15～20	10～15	609	10	C : M : A=70 : 25 : 5
罗丹明红-X	8～10	5～8	771	5	C : M=85 : 15
对甲氨基酚绿	10～15	5～10	472	10	C : M : A=70 : 25 : 5
四甲基罗丹明(TMR)	15～20	8～10	528	10	C : M : A=70 : 25 : 5
得克萨斯红-X	5～8	5～8	817	5	C : M : A=70 : 25 : 5
生物素					
生物素-XX	20～25	10～20	568	10	

a. MR=荧光团与抗体孵育的分子比，抗体浓度为 1～3mg/ml（第 2 列）或 4～10mg/ml（第 3 列）；SE=琥珀酸酯，溶剂；C=氯仿；M=甲醇；A=乙酸；D=二氧杂环乙烷；P=异丙基乙醇；NH_4=氨水；AcCN=乙腈。

4. 按照步骤 2 所确定的量，将探针溶液慢慢加入抗体溶液中，边加边搅拌，彻底混匀。将反应混合物于室温孵育 60～90min，缓慢地搅拌。
5. 可选择步骤：加入 1/10 体积的 1.5mol/L pH8.0 的羟胺羟基氯化物（hydroxylamine hydrochloride），在室温再孵育 20～30min，终止反应（用含有羟基的氨基酸去除不稳定标记物中的染料或生物素是很有用的）。
6. 通过分子筛层析（单元 6.3）可将抗体从未反应的染料或生物素中纯化出来，用 PBS 或反应缓冲液（pH7.5）过柱子，选择适宜的凝胶介质。柱子大小的选择是根据抗体的量和浓度来决定的。例如，一个 10mm×400mm 的柱子可分离 5～10mg 浓度为 5～10mg/ml 的抗体，而一个 5mm×200～250mm 的柱子可分离 1～5mg 浓度≥

2mg/ml 的抗体。对于疏水的染料（如罗丹明或得克萨斯红），作者建议在柱子的凝胶介质上面放一个 2～3cm 的 ToyoPearl 夹层用于截住未反应的染料。

7. 如果抗体浓度低于 2mg/ml，可通过透析排除多余的探针而纯化标记物（附录 3C），即用 TLC 分析直到测不到游离的探针为止（见步骤 9a）。也可将抗体标记物溶液浓缩，用一个安装有 30～50kDa MWCO 的旋转滤器装置来过滤。对于抗体浓度≥1mg/ml，而量少于 1mg 的情况，可用离心的方法去除未反应的探针，抗体可用≤0.2ml 的体积放在一个可随意旋转的柱子上，按照厂商的说明书操作。为了避免失活，在抗体标记物（低于 1mg/ml）的稳定性稀释液中要加入 BSA 或明胶，终浓度为 1mg/ml。

对于抗体与荧光团的标记物

8a. 鉴别含有荧光团-抗体的组分（抗体标记物是从柱子上洗脱下来的第一个有色组分，而未结合的荧光团滞后）。寻找一个清晰的带，它应该位于标记物和未反应的探针之间（可以是单个也可是多个条带），很明显。

9a. 用 TLC 来分析洗脱出的抗体标记物的纯度，取 1～2μl 的样品点在一个硅胶 TLC 薄片的小条（1.5cm×10cm）上，放在一个小的、充满适当溶剂的小槽中，以染料作平行对照跑样品。当溶剂的前端到达小条的 3/4 高度时，将它晾干。用一个手提 UV 灯以长波长的光来观察结果（抗体-结合物保留在起始位置，而含有未结合染料的组分迁移逼近前端的溶剂）。如果还有未结合的染料，根据需要可进一步纯化，可通过透析（附录 3C）或根据结合物的体积选一个新的旋转柱子通过离心来进行。

10a. 以染料的最大吸收波长测定吸光度（A_{dye}），同时测定 A_{280}，计算染料与抗体的比例：染料摩尔数/抗体摩尔数＝（$A_{dye}/\varepsilon^{M}Dye$）/［（$A_{dye}$-$A_{Dye}\times CF$）/$\varepsilon^{M}A_{280}$］，这里的 $\varepsilon^{M}A_{280}$ 是抗体（IgG）在波长 280nm［等于 203 000/cm/（mol/L)］处的近似摩尔消光系数，$\varepsilon^{M}Dye$ 是染料在相同波长（A_{Dye}）处的近似摩尔消光系数，CF 是修正因子，等于 DyeA_{280}/A_{Dye}（表 4.4.2）。注意，这个公式可大致适用于以抗体片段［Fab、Fab′及 F（ab′）$_2$］标记的标记物，这时用的 $\varepsilon^{M}A_{280}$ 大致适合于抗体片段。在这种情况下，抗体片段的 $\varepsilon^{M}A_{280}$ 可通过测定 1mg/ml 抗体溶液的吸光值来计算。

对于抗体-生物素标记物

8b. 制备标准曲线：将 0.25ml 以 10mmol/L NaOH 溶解的 10mmol/L HABA（可与抗生物素蛋白结合但又将被生物素置换）加至 10ml 抗生物素蛋白（0.5mg/ml）溶液中，室温孵育 10min。将 0.9ml 抗生物素蛋白/HABA 溶液分别加至 7 个试管中，在一个试管（参照管）中加入 0.1ml 分析缓冲液，pH6.0，其他 6 个试管中分别加入 0.005～0.1ml 的 0.25mmol/L 的生物素溶液（分析缓冲液配制），如果需要，用分析缓冲液将终体积调节至 1ml，混匀，室温孵育 10min。测定每个浓度点的 A_{500}，用分析缓冲液作本底，将获得的参考吸光值减去本底，以生物素的微摩尔数对 A_{500} 下降值绘制标准曲线。

9b. 在 0.9ml 生物素-HABA 复合物中加入整数量的已知浓度的生物素标记抗体，例如，加入 0.05～0.1ml 生物素标记抗体（1mg/ml）。如果需要，用分析缓冲液调节

体积至 1.0ml，室温孵育 10min，测定 A_{500} 的下降值。

表 4.4.2 抗体标记常用的荧光基团的光学性能

染料	Abs/Em[a]	ε^{Mb}	CF[c]	注意事项
Alexa 荧光体 350	347nm/442nm	19 000	0.19	蓝色荧光标记染料，每个标记染料发出的荧光要高于 AMCA。
AMCA-X	350nm/448nm	18 000	0.15	广泛应用的蓝色荧光染料，结构紧密。
喀斯喀特蓝 (Cascade Blue)	365nm/460nm	20 000	0.20	蓝色荧光染料，结构紧密，pH>6.0 时，对 pH 不敏感。
喀斯喀特蓝 (Cascade Blue)	400nm/420nm	28 000	0.65	可抵抗蛋白结合物上的淬火，与 AMCA 相比，展示的光谱更容易与 FITC 区分。水溶性。
喀斯喀特黄 (Cascade Yellow)	402nm/545nm	20 000	0.61	大量斯托克司△频移，对于与蓝色荧光染料共同使用的多色彩分析有用。
太平洋蓝 (Pacific Blue)	405nm/455nm	30 000	0.20	散发亮蓝色荧光。与 AMCA 及玛丽娜蓝不同，是较长的波长。
荧光黄	428nm/536nm	11 900	0.30	水溶性，可利用的形式是荧光黄碘代乙酰胺。
Alexa 荧光体 430	431nm/541nm	16 000	0.28	大量斯托克司△频移，是吸收峰在 400nm～450nm 之间的少数染料之一，超过 500nm 也有可见的荧光。
荧光素	494nm/518nm	68 000	0.30	广泛使用的绿色荧光标记染料（FITC），吸收峰交迭于氩离子激光器的 488nm 光谱线，有光褪色的倾向，在 pH5.0～8.0 的范围，对 pH 敏感。
Alexa 荧光体 488	495nm/519nm	71 000	0.11	是免疫荧光或其他标记应用最好的荧光素代用品，对光特别不敏感，在 pH4.0～10.0 的范围，对 pH 不敏感。比 FITC 产生更亮的效果，理想的吸收峰在 488nm。
俄勒冈绿 488	496nm/524nm	70 000	0.12	荧光素代用品，在 pH>6.0 的范围，对 pH 不敏感。
BODIPY FL	505nm/513nm	68 000	0.04	对溶剂的极性不敏感，在 pH4.0～8.0 的范围，对 pH 不敏感。光谱带宽狭窄，中性染料。 对蛋白标记物，与一个胱氨酸残基连接的琥珀酸亚胺酯是更好的反应形式
俄勒冈绿 514	511nm/530nm	70 000	0.19	高度不感光，在 pH>6.0 的范围，对 pH 不敏感。吸收峰在 514nm。
曙红	524nm/544nm	90 000	0.25	邻苯二胺（DAB）的有效感光氧化剂，发磷光（终生约 1Ms）。对磷光阴离子移变测量法有用。是来自荧光素、BODIPY FL 染料、丹磺酰和香豆素的 FRET[d] 的有效接收器。
Alexa 荧光体 532	531nm/554nm	81 000	0.09	亮及光稳定染料，光谱介于荧光素和四甲基罗丹明之间。水溶性，极好的蛋白标记染料。
四甲基罗丹明(TMR)	555nm/580nm	65 000	0.30	广泛应用的橙色荧光标记染料（TRITC），pH 不敏感。高度的光稳定性，与蛋白质连接后可能会形成非荧光聚合体。
Cy3	553nm/570nm	150 000	0.08	发橙色荧光，亮、水溶性的青蓝染料。
Alexa 荧光体 546	556nm/573nm	104 000	0.12	很亮、光稳定，四甲基罗丹明（TAMRA 或 TRITC）和 Cy3 的代用品。546nm 是理想的激发波长，水溶。

续表

染料	Abs/Em[a]	ε^{Mb}	CF[c]	注意事项
罗丹明红-X	570nm/590nm	120 000	0.17	每个连接的染料——罗丹明红-X琥珀酸亚胺酯（Rhodamine Red-X succinimidyl ester）通常比丽丝胺罗丹明B磺酰氯（Lissamine rhodamine B sulfonyl chloride）产生更高的荧光，在水中更稳定。
Alexa荧光体568	578nm/603nm	91 300	0.46	丽丝胺罗丹明的代用品，亮、光稳定，568nm是理想的激发波长。极好的蛋白标记染料，水溶。
Alexa荧光体594	590nm/617nm	73 000	0.56	得克萨斯红的代用品，亮、光稳定，594nm是理想的激发波长。极好的蛋白标记染料，水溶。
得克萨斯红	595nm/615nm	80 000	0.20	具有与荧光素容易区分的光谱，对于每个连接的染料，得克萨斯红琥珀酸亚胺酯（Texas Red succinimidyl ester）通常比得克萨斯红磺胺氯（Texas Red sulfonyl chloride）产生更高的荧光，在水中更稳定。
Cy5	650nm/667nm	250 000	0.05	可被HeNe激光器的632nm波长所激发。
LaserPro	807nm/812nm	229 000	0.12	产生相对低的量子，发射的光用眼睛看不见。

a. Abs/Em是染料的吸收与发射的最大值。

b. ε^M是染料在cm/(mol/L)时的摩尔消光系数。

c. CF是用下列公式确定的修正因子百分比：CF＝染料的A_{20}/染料的$A_{最大值}$。

d. FRET，荧光共振能量转移。

△译者注：斯托克司（Stoke），为动力黏度单位，有译作“泡”。

10b. 用标准曲线来确定产生A_{500}变化时的生物素的微摩尔数，以测定用于置换HABA的生物素的微摩尔数与抗体的微摩尔数之间的比例（它可以表示生物素标记的程度）。例如，对于IgG结合物：（15nmol生物素×145 000 g/mol）/（4.35mg/ml抗体×0.1ml）＝5mol生物素/mol抗体，此处的145 000是IgG抗体的分子质量，0.1ml是生物素-抗体标记物样品（1mg/ml）的体积。

支持方案　估计抗体浓度的方法

估计抗体浓度有三种不同的方法。第一，用各种特定染料的修正因子（见基本方案，步骤10a）来修正标记物的A_{280}从而得到这种染料结合物的A_{280}。第二种方法是根据蛋白质的初始浓度来估计，如果在纯化过程中出现一些沉淀，可以假设丢失了15%～20%或更多。第三种方法是用蛋白质分析的方法（附录3B）来测定标记物的浓度，然而这种方法是有疑问的，因为大部分蛋白质分析会受到来自荧光基团的干扰。

参考文献：Aslam and Dent，1998；Hermanson，1996；Haugland，1996

撰稿人：Rosaria P. Haugland

（陈实平 译）

第5章 显微镜术

本章描述显微镜的使用方法，包括光学显微镜术在不同用途下的使用原理，如相差、差分干涉相差（DIC）及荧光显微镜术，不同用途显微镜的校正与调整，标本的制备与标记，以及精确成像的方法。

随着摄像机、数码相机及电子成像技术的发展，使用显微镜观察微细结构的技术也在不断改进，而成像质量及精确度主要取决于显微镜的校正与调整。本章单元5.1详述科研型显微镜的亮视场、相差及表面荧光显微镜术的校正方法。该单元重点阐明为何校正与调整显微镜对于获得最佳成像质量及精确的数值测量至关重要。也讲述了Kohler照明学的原理，为探讨影像形成及用于亮视场与相差成像的显微镜校正打下基础。本章单元5.1也叙述了相机的连接方法、影像形成的校准方法、显微镜的维护与清洁方法，以及显微镜性能的评估方法。

单元5.2阐述荧光显微镜术及其在生物标本成像方面的应用。荧光显微镜术很早就已用于观察细胞结构，其原理在于荧光分子能吸收特定波长的光，然后发出更长波长的光。本单元阐述了如何选择波长选择装置及物镜（可参见附录2D）、如何使荧光标本成像及如何获得最佳亮度与最佳分辨率。近年来，由于通过经济型相机与荧光显微镜获得数字化图像的收集、存储及分析软件的出现，数字化分析技术已成为图像档案管理的最佳选择，逐渐取代了传统的成像技术，该内容在本单元“数字化暗室”中有所阐述，并谈到与传统成像技术相比，数字化成像技术的优点。

单元5.3阐述免疫荧光染色技术，它可能是目前应用荧光显微镜最多的技术。荧光团标记抗体可作为敏感而特异的探针，来标记固定细胞和/或通透性细胞内的抗原，并能定位特定的蛋白质。若用不同荧光团标记两个或更多抗体，并用它们来染细胞的话，则同时可见多种蛋白质的分布。本单元讲述固定细胞与细胞染色的基本方法，以及发现并解决潜在问题的技巧。

随着选择性标记细胞内细胞器的荧光染料的发现，荧光显微镜又多了一个用途，即用来检测活体内特定细胞分子的空间分布。单元5.4阐述用选择性荧光探针标记三种细胞器（内质网、高尔基复合体与线粒体）的方法，包括用$DiOC_6(3)$、C_6NBD-神经酰胺及BODIPY-神经酰胺来实时检测其活动。

另一个较好的成像系统为共聚焦显微镜，它能收集标本内薄聚焦面上的光线而清晰成像。单元5.5阐述共聚焦显微镜在细胞生物学领域的应用；详述如何实现共聚焦光切片及如何重建标本的三维图像；也谈到了不同类型的共聚焦显微镜系统（包括激光扫描、快速扫描及双光子）及其优缺点，并提供一些建议，便于该仪器的使用。

单元5.6阐述采用免疫过氧化酶法定位细胞内抗原。采用这种方法，在光学显微镜及电子显微下均能检测蛋白质的分布，进而了解不同放大倍数的细胞组织情况。本单元涉及一些关于确保抗体进入抗原所在的细胞内位置、保持抗原特性以及在固定与染色过

程中维持较好的细胞形态的技巧。另外，也谈到了免疫过氧化物酶染色的优缺点以及确保其成功的操作技巧。

低温免疫金电子显微镜术（单元5.7）可在亚细胞水平检测抗原，具有分辨率高的特性。本技术涉及细胞或组织超薄冰冻切片的制备，并用免疫金标记切片以定位抗原。由于不需要苛刻的有机溶剂如用于可塑性包埋的有机溶剂，蛋白质抗原特性与精细超微结构的保持比传统的电镜包埋法好。低温免疫金标记时，葡萄球菌蛋白A结合的不同大小的金粒子可用于标记与抗原结合的不同抗体，故可同时定位多种抗原，而其他免疫电子显微镜术标记法则不能同时定位多种抗原。单元5.7还阐述了如何运用低温免疫金电子显微镜术标记标本，包括固定、包埋、冰冻切片及标记。

单元5.8阐述相关视频光学/电子显微镜术（CVLEM），它集荧光显微镜术和电子显微镜术于一身，用于分析细胞内具有复合形态的动态结构。该技术通过监测表达荧光报告蛋白的细胞，如表达绿色荧光蛋白嵌合体的细胞，来鉴定和监测感兴趣的结构。首先固定细胞，然后用电子显微镜通过三维结构重建的方法来分析同一个感兴趣的结构。在标本制备的各个阶段，都有一定的技术要求。而该技术能以惊人的高分辨率检测细胞内复合结构的组织及形态，如Golgi复合体、膜转运介质及细胞骨架成分。

单元5.9阐述了一种荧光成像技术，即荧光斑点显微镜术（FSM），该技术用于观察肌动蛋白与微管蛋白等细胞内蛋白复合物的动力学、运转及更新。该技术原理在于向大分子结构内注射入低浓度的荧光亚单位，它与未被荧光标记的内源性亚单位共同装备蛋白质，这样就可在分辨率有限的荧光图像中观察到感兴趣的结构内的荧光斑点排布。荧光斑点排布的改变可用于定量分析结构的组装、拆解及运动。与传统的荧光成像技术相比，该技术大大减少了离焦荧光，所以荧光标记结构的荧光斑点大大增强了。此外，与仅可检测小范围标记部分的光敏化和光漂白技术相比，FSM则可检测整个细胞内的蛋白质动力学。作为该技术有用性的例证，本章描述了采用FSM技术研究活细胞内微管蛋白与肌动蛋白细胞骨架的动态变化的方法，并详述了荧光标记微管蛋白与肌动蛋白的方法及延时成像技术。

近年来，以水母（*Aequoria victori*a）的绿色荧光蛋白作为探针来研究活细胞甚至活体内的特定蛋白质的技术在逐步发展。单元5.10介绍绿色荧光蛋白（GFP）及其基因变异体，并举例说明如何用GFP来研究活细胞内特定的GFP融合蛋白的定位及迁移。

撰稿人：Jennifer Lippincott-Schwa

（冯　若　张钦宪 译）

单元5.1　光学显微镜的校准及调节

本单元讲述经典的研究型复合光学显微镜以透射及反射照明成像模式工作时校准与调节的方法，而这两种成像模式是该显微镜在生物医学研究领域的常用模式。透射光模式包括亮视场和相差，而反射照明的主要模式为荧光显微镜术。

光学显微镜的主要部件

熟悉光学显微镜的主要部件对参阅显微镜使用手册非常必要。图 5.1.1 为配备为透射光及表面荧光的直立式研究型复合光学显微镜的模式图。按图中各部件的位置，找到并转动各种调节螺旋（聚光镜调焦螺旋），确保它们安装正确。在此及以下各单元中，z 表示与显微镜轴平行，x 与 y 表示与显微镜轴垂直。

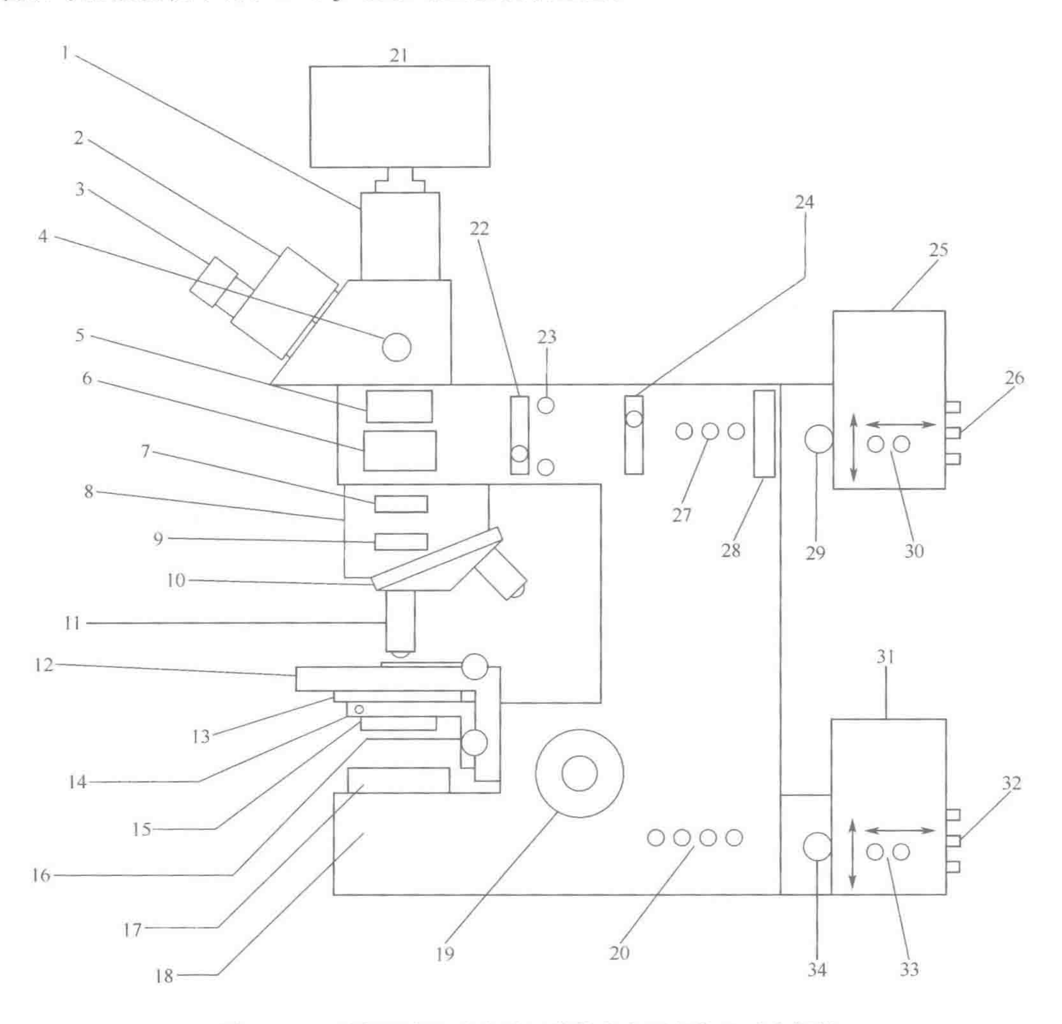


图 5.1.1　研究型直立式光学显微镜的主要部件及对中螺旋

1. 相机接头　2. 双目镜　3. 目镜　4. 光束旋钮　5. 放大倍数转换器　6. 滤镜转换器　7. 分析仪插孔　8. 镜筒　9. DIC 棱镜插孔　10. 物镜转换器　11. 物镜　12. 载物台　13. 聚光镜；光阑及转换器　14. 对中装置　15. 偏振器插孔　16. 调焦螺旋　17. 视场光阑　18. 直立式显微镜底座　19. 粗调焦螺旋　20. 滤光片和散光片　21. 相机 22. 表面照明视场光阑　23. 表面照明视场光阑对中装置　24. 表面照明聚光器光阑　25. 表面照明灯壳　26. 镜子：调焦及对中装置　27. 滤镜　28. 遮光器　29. 灯泡：调焦螺旋　30. 灯泡：对中装置　31. 透射灯壳　32. 镜子：调焦及对中装置　33. 灯泡：对中装置　34. 灯泡：调焦螺旋

成像部件

载物台上的机械装置固定标本载玻片。旋钮可控制 x-y 方向的移动，游标尺可标记 x-y 方向上的位置。转动式载物台常用于差分干涉相差（DIC）显微镜。物镜常是固定的，旋转显微镜体上的粗调或细调焦螺旋可在 z 轴上移动载物台，借以调节焦距。检测细调焦螺旋上的刻度，对于研究型显微镜，常为 1μm/U。

检查物镜转换台上的不同物镜，每个物镜常有如下标记：放大倍数（如 60×）；光学校正度（复消色差透镜比萤石好，萤石比消色差透镜好）；标记计划（视场的中央及边缘是否都在焦点上）；数值孔径（NA，可测量物镜所接受的来自标本的光锥的半角；图 5.1.2）；所用的浸入介质（如标本与物镜前镜头之间的空气、油、水或甘油）；盖玻片厚度；光管长度（以前为 160mm，目前则为无限大）以及其他特殊特点，如相差、DIC 或远工作距离。工作距离指物镜前部分与标本之间的距离，它随物镜放大倍数及物镜数值孔径的增大而变短。从低倍镜到高倍镜依次检查物镜是否安装妥当。最好先在低倍镜下找到标本或部分标本，然后再转至高倍镜，在较短工作距离下观察标本。物镜转换时，大数值孔径与短工作距离的油浸物镜可固定物镜转换器，这样可防止物镜前部分滑至盖玻片边缘的封固剂中。注意下降物镜转换器来成像。

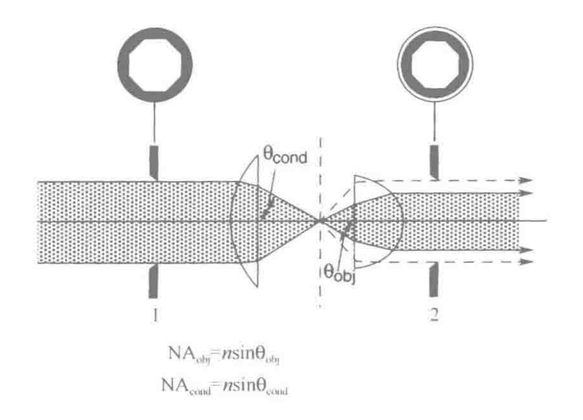


图 5.1.2 物镜与聚光器采光的数值孔径（numerical aperture，NA）

物镜的数值孔径（NA_{obj}）取决于物镜孔接受来自标本的光锥角度；聚光器的数值孔径（NA_{cond}）则由聚光器的光阑决定，而当聚光器光阑开得较大时，聚光器的数值孔径则会受到聚光器最大数值孔径的限制

1. 聚光镜光阑 2. 物镜后聚焦面

显微镜聚光透镜常适于观察厚为 1mm 的玻片。物镜适于观察厚为 0.17mm（1.5 号盖玻片厚度的平均值）盖玻片。若盖玻片较厚（如 1 号）或较薄（如 2 号），则成像质量会下降，对于大数值孔径的非油浸物镜（干式物镜）来说尤甚。对于油浸物镜来说，当浸油和盖玻片折光率（约 1.515～1.52）匹配的话，则盖玻片的厚薄对成像质量影响不大。比 1.5 号薄的盖玻片常用于油浸物镜，这样可在较大范围内调节焦距。

现代的研究型光学显微镜，来自物镜及物镜转换器的成像光为离焦光，它所投射影像为“无限大”（见图 5.1.3，左侧）。而这个物镜上方的无限空间将使得滤光镜的插入

不会改变图像在中间像平面的焦点位置。无限空间上方的正聚焦透镜为筒镜，它可使成像光到达目镜或相机的焦点。

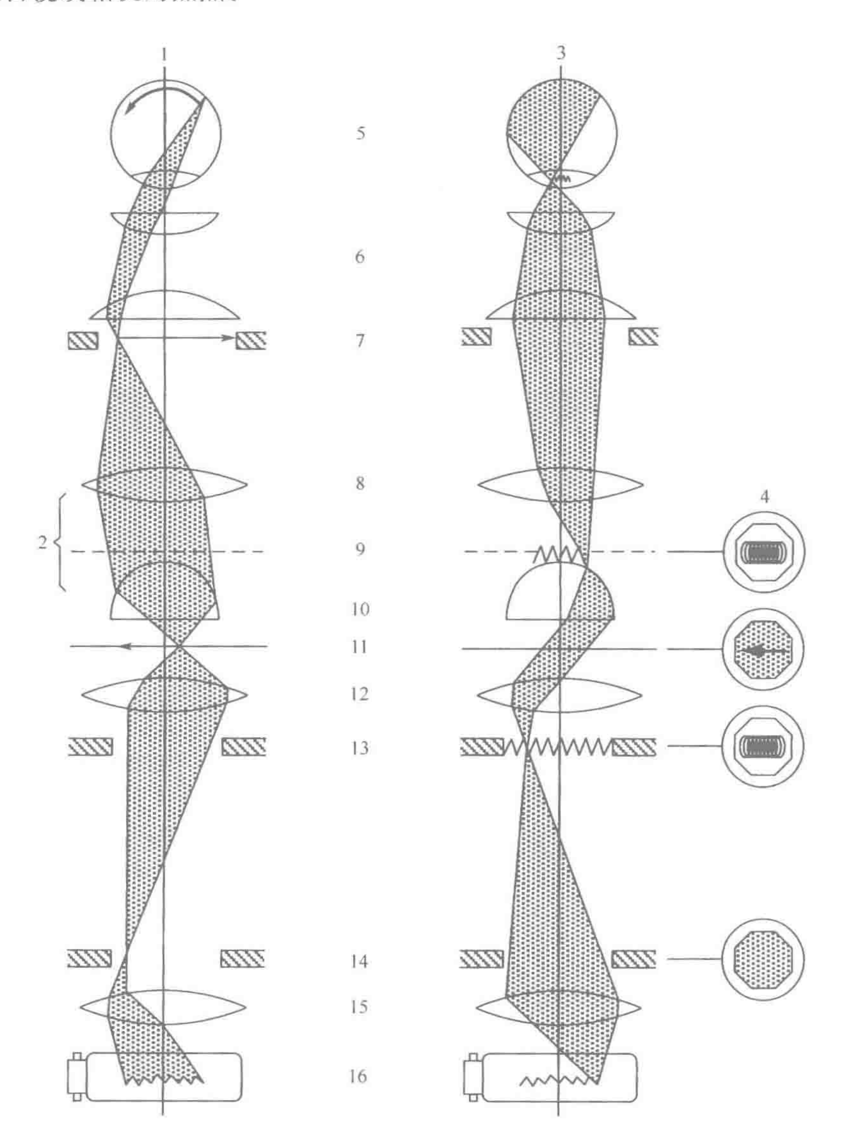


图 5.1.3　调整为透射光 Kohler 照明模式的亮视场显微镜的成像及照明光路
由 Keller 改进而来（1998）

1. 成像光路　2. 无限空间　3. 照明光路　4. 视野　5. 眼或相机　6. 目镜　7. 中间像平面　8. 管式透镜　9. 物镜后聚焦平面　10. 物镜　11. 标本　12. 聚光镜　13. 聚光器光阑　14. 视场光阑　15. 聚光镜　16. 灯泡

检查显微镜无限空间内的以下可能插件：

1. DIC 显微镜的 DIC 棱镜，常位于物镜的正上方。
2. 分析仪；用于 DIC 显微镜术（对于亮视场、相差及荧光显微镜术，则应将其从光路中移开）。

3. 反射照明器方形滤镜组转换器。这些装置常带有 2～4 个用于荧光显微镜术的方形滤镜组合，每个滤镜组合都有专为不同荧光团设计的激发滤镜、发射滤镜及分色镜。注意滤镜组合上的数字，并在滤镜转换器外侧相应的位置加以标记，以便找出适合于已知荧光团的方形滤片组合的位置。
4. 放大倍数转换器及贝特朗（Bertrand）透镜。镜筒的放大倍数选自转换器，待选倍数为 1.0×、1.25×、1.5×及 2×。转换器上通常有安装贝特朗透镜的位置，该透镜与目镜联合产生物镜后焦平面的镜像（图 5.1.3，右侧）。该装置是检测 Kohler 照明模式调整过程中灯泡图像的对中及聚焦的一个重要装置，也是调节聚光器光阑的重要装置（参见透射部件）。

该装置可使光线在双目镜与照相机端口之间进行转换，检测每个方向上光线的百分比。对于荧光显微镜术来说，重要的是有 100%的成像光能到达眼睛或相机。

在镜筒上标有眼睛所感知的目镜放大倍数（如 10×），注意有 2 或 3 种选择。至少有一个目镜是可移动的，缩短或加大两目镜间距，找出合适的瞳距，从而使双眼等焦距。

检查相机接头的型号及其是否与检测仪匹配，有几种不同型号的相机接头。其中一种型号可以用一个目镜镜筒（非双目镜镜筒）和一个连有相机镜头的投射目镜将图像投射到相机检测仪上。对于胶卷式照相机（胶卷≥35mm）及某些带有大尺寸检测仪（如 1in，相当于 2.54cm）的视频电视摄像机来说，这种方法非常普遍。目前视频、慢冷却及先进的扫描电荷耦合器件（CCD）相机有小检测仪（≤2/3in，相当于 1.7cm）。这些相机需要较小的投影放大倍数或者无此要求。对于无此要求的相机来说，检测仪就装在中间图像平面，即物镜的焦平面上，且不需目镜和投影镜头。

透射部件

灯泡常用可控型 100W 低压石英卤素钨丝灯。有些灯壳没有将灯泡调至中心的调节装置，灯座是预先固定好的。大多数灯壳带有沿 x-y 方向调节灯座位置的装置，先进的灯壳后面还有一个镜子，用来反射显微镜轴向上的灯泡后部的影像，这个镜子常可调节灯泡镜像在 x、y 和 z 方向上的位置。灯壳侧面常有一旋钮，用来在 z 方向上来回移动聚光镜，进而使钨丝影像聚焦在聚光器的光阑平面上。

常在显微镜基部的插槽内插入一个散光片和几个滤光片。散光片有助于将聚光器光阑水平上的一些影像均匀地充满聚光器孔径，这对获得较高分辨率至关重要。热反射滤光片（如 BG58）可阻挡红外光，摄像机对这种波长的光非常敏感，而人眼则对它不敏感；绿色滤光片常适于观察活细胞。通常 540nm 左右有 40nm 带宽的高效干涉滤光片最好。各种中密度滤光片均没有波长选择性，如果进入相机的光是逐渐减弱的，则选用这种滤光片。

视场光阑常位于镜子的正上方或正下方，镜子用来改变射向聚光器的光线方向，聚光器用来调节标本区域的照明情况（图 5.1.3，左图）。

对于偏振和 DIC 显微镜术，偏振器就插在聚光器光阑的下方。在其他情况下，则要从光路中移去偏振器。

聚光器调焦旋钮转换器可沿显微镜 z 轴方向移动聚光器，使视场光阑的影像聚焦在

标本上。

通常，聚光器架上有两个旋钮用于在 x-y 水平移动聚光器，调节这两个旋钮使 z 轴上视场光阑的影像居中。

聚光器光阑位于聚光器底部。它可调控标本照明系统的聚光器光锥角度（NA）（图 5.1.2）。

聚光器装有转动架，转动架上装有用于特殊像差技术的插片，如相差显微镜术和 DIC 显微镜术。每种插片都应有与其匹配的物镜。对于相差显微镜术，插片设计为不同直径的环形，用以匹配相差物镜的相环；对于 DIC 显微镜术，插片为典型的 DIC 棱镜，用以匹配特定的物镜。如果要察看这些插片及开关聚光器光阑的话，就要松开固定屏（locking screen）并将其上下倒置，再从聚光器架上移去聚光器方可。

聚光器的主要作用是采光，且对于不同数值孔径的物镜，在视场（图 5.1.3，右侧）与物镜孔径（图 5.1.2）处均可获得均匀的亮度。注意聚光器上的标记，看看它适于干式（air/dry）玻片还是油浸玻片。干式（非油浸）聚光器的 NA 值≤0.9，且不能配合浸油使用；配合浸油使用时，油浸聚光器的 NA 值常为 1.0～1.4。

反射照明部件

反射照明光源常为 HBO 50-W 或 HBO 100-W 的汞弧灯，或是相似瓦数的氙气灯。这些灯泡要小心对待，若处理不当，会引起爆炸。安装前要用 70%乙醇清洗玻璃壳，洗去指印或其他东西，以防止热斑造成的灯泡碎裂。找到调节旋钮来调节灯泡在 x-y 方向上的位置；也要找到后面的镜子及其 x、y 与 z 方向调节旋钮；明确灯泡聚光镜的调焦旋钮。首先依操作手册说明来安装灯泡，妥当插入聚光镜，并在显微镜后面装好灯壳。在此之前，不要开灯。这些灯泡发出的光为强光，汞灯光在紫外光范围内有大的峰值。因此，在操作或安装这些灯泡时，紫外光防护玻璃常被破坏掉。灯泡的使用时间越长，开关次数越多，则光密度就会越低，灯泡爆炸的可能性越高。注意查看灯泡电源上的计时器，不要超出所推荐的限制。

光漂白是荧光显微镜术的一个大问题。当相机曝光或用肉眼观察时，要用遮光器挡住来自标本的光线。

热反射滤光片用来阻挡标本的红外光到达相机；中密度滤光片则用于降低荧光的光密度，降低幅度为各个滤光片滤光的总量。

反射照明聚光器光阑可调控照明强度，有些显微镜没有这种光阑。

反射照明视场光阑可调控标本的照亮区域。找到对中旋钮来调控视场光阑在 x-y 方向上的位置。

参见成像部件。

亮视场与荧光显微镜术成像及 Kohler 照明光路的基础知识

学习光学显微镜校准的第二步是掌握成像与 Kohler 照明光路的基础知识，以及主要光学部件与光阑的功能。图 5.1.2～图 5.1.4 已对此有所概述。

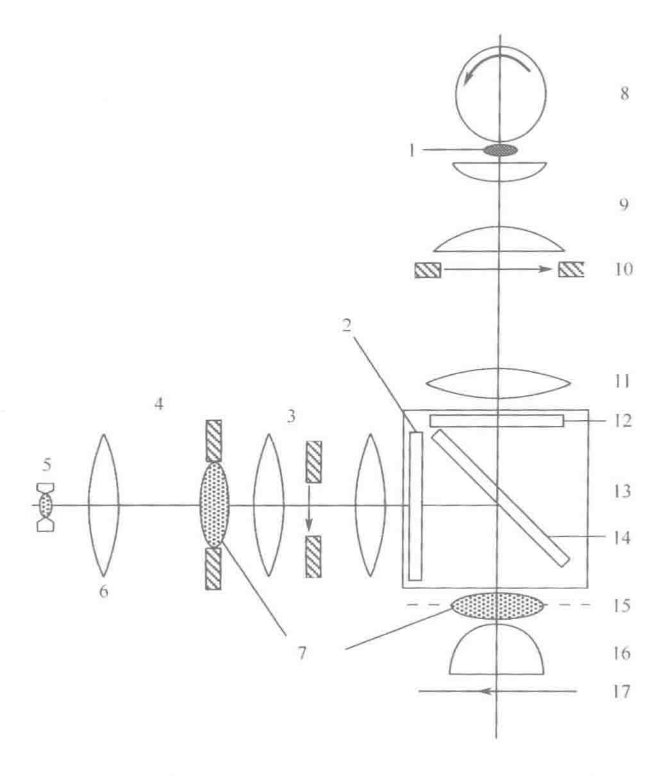


图 5.1.4 调整为表面荧光 Kohler 照明模式的显微镜

1. 电弧图像 2. 激发滤镜 3. 视场光阑 4. 聚光器光阑 5. 弧光灯 6. 聚光镜 7. 电弧图像 8. 眼睛 9. 目镜 10. 中间像平面 11. 管式透镜 12. 发射滤镜 13. 滤镜组合 14. 双色分束镜 15. 物镜后焦平面 16. 物镜 17. 标本

成像光路

图 5.1.3 的左上部显示来自物镜的成像光光路。物镜联合筒镜在中间图像平面上共同呈现了标本的真实放大图像。目镜对眼睛所感知的图像进行了二次放大。眼睛所感知的放大倍数是物镜放大倍数与目镜放大倍数的乘积，再乘以在显微镜物镜与目镜之间的镜筒内所有附加透镜的放大倍数。

相机检测仪——胶卷、录像或电荷耦合器件（CCD）——安装在中间图像平面上，相机所感知的放大倍数由物镜与筒镜产生。相机装在目镜上方时，相机镜头会将来自目镜的离焦光聚焦在相机检测仪上，相机镜头也会改变检测仪感知的图像的放大倍数。将放大的物镜图像投射到相机检测仪上需要特殊的接头（参见成像部件，相机接头），但若投射到目镜则不需要特殊接头。

透射光路

在标准 Kohler 照明图解中（图 5.1.3），将亮视场显微镜的照明光路调整为 Kohler 透射光路（右侧）。灯泡聚光镜将光源上的一个点聚焦在聚光器内聚光镜的前焦平面上，而聚光器光阑就位于这个前焦平面上。光线是由聚光器透过标本投射过来的离焦光，可

均匀地照亮标本。物镜收集离焦照明光，并将光源影像聚焦在物镜的后焦平面上，该焦平面位于物镜的后孔处（图 5.1.2）。在中间图像平面上和眼睛视网膜或相机检测仪处，光源再次离焦。而在中间图像平面和眼睛视网膜之间或中间图像平面上和相机检测仪之间，光源在目镜上方约 15nm 的目镜出瞳处聚焦。这个位置又称为眼点，它是观察时眼睛在物镜上方的位置（图 5.1.3，右侧）。

聚光器光阑通过聚光镜调控标本照明的 NA（光锥角度）（图 5.1.2）。打开光阑增大照明孔径，进而提高光强度及亮视场光学显微镜术的分辨率。注意图 5.1.3 的右侧显示聚光器光阑图像的聚焦在物镜后焦平面与目镜出瞳处，在此处灯泡图像沿显微镜轴聚焦。

视场光阑通过显微镜的成像光束（图 5.1.3，左图）。注意聚光器照亮的视场区域，另外注意视场光阑位于灯泡聚光镜与聚光器之间，在该平面上灯泡图像是离焦的（比较图 5.1.3，左侧与右侧）。当聚光镜将视场光阑图像聚焦在标本上时，视场光阑就会聚焦于中间图像平面和眼或检测仪上。

反射照明的光路

图 5.1.4 显示反射照明器与通过物镜的 Kohler 照明的光学校准。和透射光路（图 5.1.3）一样，灯泡聚光镜将光源聚焦在聚光器光阑上，聚光器会照亮视场光阑，且另有一透镜收集这些光线，并通过反光镜将其投射到物镜。光源图像聚焦在物镜的后焦平面上，这保证了到达标本水平的光线为离焦光。对于反射聚光显微镜术来说，带分色镜的方形滤镜组合和激发滤镜、发射滤镜的联合应用，可有效地将激发光反射到物镜，并仅将标本发出的较长波长的荧光有效地传送到目镜或相机（参见单元 5.2）。

基本方案 1　亮视场，透射显微镜术的 Kohler 照明校准

下面的步骤是在石英-卤素钨丝和灯泡聚光镜均可调节的前提下进行的。价格低廉的非研究型复合显微镜可能在底座上装有照明器，且没有灯泡调节装置。这种显微镜靠毛玻璃滤镜来达到均匀照明。对于这种显微镜底座的操作，可略去步骤 2、3、4、8。

1. 可能的话，校准时可从透射光路中移去散光片，这样可在聚光器光阑平面及物镜后焦平面上看到光源的勾边图像。校准完成后，再插入散光片。
2. 灯丝对中与聚焦在聚光器光阑平面附近。移去聚光镜，在载物台上放一张镜纸，关闭视场光阑并调节光源强度达到适当照亮镜纸；转动灯泡调焦旋钮在 z 方向上移动聚光镜（或灯泡），直到灯丝图像聚焦在镜纸上为止；用灯壳上的调节旋钮，粗略对中显微镜轴上的灯泡，再用灯壳上相应的调节旋钮来调节镜子图像（如果有镜子的话）。
3. 在聚光器架上放一张镜纸，并将聚光器架升高至距载物台顶部约 20mm 处，这是安装和聚焦聚光器时聚光器光阑的位置。
4. 重新将灯泡和镜子图像聚焦在镜纸的这个位置。如果没有镜子图像，就将灯泡图像对中；如果有镜子图像，再进一步调整至这两个图像并排充满聚光镜孔径。然后移去镜纸并将聚光镜放回原位。

5. 将能吸收光线的检测标本（如染色的肌肉标本）置于载物台上，并在低倍物镜(10×或16×）下得到标本的聚焦图像。从物镜镜头的工作距离（如对于标准的10×镜头，约4mm）来估计焦点位置，转动粗调焦螺旋使标本靠近盖玻片（约16mm)，并从显微镜侧面来观察物镜位置。
6. 向上移动聚光镜，使之靠近载玻片的下表面，视野光阑及聚光镜光阑始终处于打开状态。再转动粗、细调焦螺旋，直到用目镜可以观察到清晰的图像。
7. 调节聚光器 x-y 方向调节螺旋及聚光器调焦螺旋，使对中的视场光阑图像聚焦在标本上。首先用 x-y 转换旋钮调小视场光阑，直到聚光器将图像边缘聚焦；然后当图像对中时再进一步调小视场光阑（视场光阑开至正好照亮感兴趣的部分时，可以得到最好的相差)。
8. 调节灯壳上调焦旋钮及调整旋钮，聚焦的灯泡图像及镜子图像位于物镜后聚焦面的中心。联合使用放大倍数转换器的贝特朗透镜与目镜，或者用望远镜取代目镜，或者移去一个目镜，仅在镜筒内观察物镜后孔（后聚焦面的位置；图5.1.2)。聚光器光阑始终处于打开状态。再次调节灯泡聚光镜及镜子，直到灯泡图像位于焦点位置，且并排充满物镜孔。
9. 调整聚光器光阑的开大程度，使其在物镜后聚焦面的图像（参见图5.1.2及图5.1.3右侧）直径略小于物镜后孔。

   有些研究型聚光镜还有聚光器光阑的对中装置。聚光器光阑图像应位于物镜后孔的中央。
10. 找到适于观察标本的光亮度来完成低倍物镜的聚焦：通过调节电源变阻器或在照明光路中插入中密度滤光片来调节光源亮度。
11. 将转换器转至40×高倍干式物镜。用聚光器调焦螺旋与聚光器架 x-y 方向调节螺旋，聚焦及对中视场光阑。观察物镜后孔（图5.1.2)。调节聚光镜光阑，使聚光器照明数值孔径与物镜数值孔径刚好匹配。每次转换物镜后都要重复该步骤。

    注意： 对于低倍物镜来说，聚光镜光阑图像调整至仅约为40×后孔直径的一半。该图像直径与物镜后孔直径的比值，和聚光器照明数值孔径与物镜数值孔径的比值相同（图5.1.2)。当聚光器照明数值孔径与物镜数值孔径相同时，光线充满物镜孔，且获得物镜数值孔径的最大分辨率。
12. 转动物镜转换器至高倍油浸物镜（60×～100×，NA为1.25～1.4)，但在油浸物镜归位前要停止转动物镜转换台，并在聚光器光束焦点正上方的盖玻片上滴一小滴浸油。浸油的折光率应接近于盖玻片的折光率，且保证没有灰尘及气泡。
13. 转动物镜转换器将油浸物镜归位，即听到咔咔声时。如果可以的话，适当下调物镜转换器。

    尤其要注意的是：使用油浸物镜时只能转动细调焦螺旋。
14. 移动目镜（或用望远镜或贝特朗透镜）观察物镜后孔。尽可能大地打开聚光器光阑，试图使其图像与物镜后孔匹配（图5.1.2)。

    如果聚光镜为干式的，并非为油浸而设计时，上述内容将是不可能的。原因在于干式聚光镜的NA≤0.9，且物镜后聚焦面上呈现的聚光器孔的图像大小或聚光器光阑图像大小由 NA_{cond}/NA_{obj} 的比值决定（图5.1.2)。

15. 观察物镜后孔，并调节灯泡图像的焦点及位置，在尽可能均匀的光线下，使其焦点位置的图像充满物镜孔。
16. 将目镜放回原位（或移去贝特朗透镜）观察标本。调节视场光阑至其边缘刚好与视野匹配。

    使用价格低廉的聚光镜时，即使在最适位置，视场光阑边缘图像的聚焦效果也不好。

17. 如果可能的话，给聚光镜涂油以得到最高的分辨率及最好的图像质量。给聚光镜涂油时，应移开物镜和载玻片后再涂（与物镜相比，它应涂更多的浸油且没有气泡产生）；然后将载玻片放回原位，并再次进行物镜调焦。

    在给聚光镜涂油前，一定要查看是否标有 NA>0.9 以确保不是干式聚光镜。

18. 观察物镜后孔，并再次调节灯泡图像的焦点及位置，在尽可能均匀的光线下，使其焦点位置的图像充满物镜孔。

    涂油后，当开大聚光器光阑时，聚光器将完全照亮孔径。

    检查浸油内是否有气泡的最好方法是察看物镜后孔。如果有气泡的话，就用镜纸把浸油擦掉，然后重复步骤 12～18。

19. 把散光片重新插入照明光路中。
20. 使用一天后，用镜纸擦去物镜及聚光镜上的多余浸油，以防止浸油滴在标本上。

    但并不需要每次使用后都完全擦净光学部件上的浸油。

基本方案 2　目镜的校准

双目显微镜常装有目镜间距的调节装置和每个眼睛视觉敏锐度的调节装置，旨在将图像聚焦在眼睛，且不感到视觉疲劳或不舒服。对于经典显微镜来说，只有左侧目镜镜筒或目镜是可调的；然而，如果显微镜底座上有目标十字标线，且十字标线可转至视野的话，则通常两个目镜均可调。

1. 在低倍镜（10×或 16×）下，聚焦在载物台上的染色标本上（如染色的肌组织标本），并调整为 Kohler 照明模式。
2. 移动目镜镜筒底部，即收拢或分开两目镜，以找到适合观察者的瞳距。

3a. 如果显微镜有目标十字标线：将十字标线转至视野。闭上左眼，调节右侧目镜上的屈光度调节环，直到目标精确地聚焦在右眼；然后闭上右眼，调节左侧目镜上的屈光度调节环，直到目标精确地聚焦在左眼。移去目标观察标本。

3b. 如果显微镜没有目标十字标线：将右侧目镜镜筒设置为 inter-eyepiece 模式（可能的话）。闭上左眼，将视野中心附近的微细结构较好地聚焦在右眼。然后闭上右眼，调节左侧目镜上的屈光度调节环，直到标本的微细结构较好地聚焦在左眼。双眼同时睁开时，稍微调节一下左侧目镜镜筒的焦点。

基本方案 3　表面荧光显微镜 Kohler 照明模式的校准

眼睛对绿光最敏感。因此，以下步骤最好采用可产生绿色激发光的滤镜（如适于罗

丹明的滤镜）。

1. 去掉一个物镜，转动物镜转换台使开放部分的中心位于显微镜轴上。将一白色卡片置于载物台上，卡片距物镜转换台约 2～3cm（约为物镜后聚焦面的位置；图 5.1.4）。

   有些显微镜的灯泡调节装置很特殊。该装置装在物镜转换器上，可将反射照明电弧及电极图像投射到该调节装置筒内的小散光屏上。

2. 按照操作手册，把汞灯装在灯壳内，灯壳装在显微镜后方。
3. 打开电源，燃亮灯泡（约 10min 才燃亮电弧）。

   注意：确保开灯前关闭其附近的计算机。原因在于点燃电弧等离子区的高压脉冲会损坏电子设备。实验室人员应保护好眼睛，防止紫外光的伤害。

4. 视场光阑始终关闭，而聚光器光阑（如果有的话）始终打开。
5. 在散光玻璃屏或载物台上的白色卡片上，于两电极端部之间可见电弧图像。调节灯泡调焦旋钮来得到电弧和电极的聚焦图像。调节灯泡的 x-y 方向旋钮，来粗略对中电弧和电极端部的图像（参见图 5.1.3）。
6. 如果有灯泡反光镜的话，转动其调节旋钮以聚焦电弧及电极端部的镜像，并将其调至目标的中央。

   通常，电弧的主像和镜像应调至并列，且有轻微重合，但却位于显微镜轴的中心。

7. 将待测荧光标本置于载物台上，转动物镜转换器至低倍镜；选择适合该荧光标本的滤镜；反射照明器的视场光阑始终处于打开状态；打开遮光器观察标本。
8. 聚焦标本，再调小视场光阑，直至边缘进入视野。调节视场光阑的 x-y 方向旋钮，将视场光阑图像调至视野中央。调小视场光阑直至照亮感兴趣的区域。
9. 转至高倍物镜。对于油浸物镜来说，在感兴趣区域上方的盖玻片上滴一滴浸油（直径约 2mm），要避免有灰尘和气泡产生；小心旋转物镜转换器，将物镜接触浸油；打开遮光器，并聚焦在标本上。重新调节视场光阑的大小和中心。
10. 为避免光漂白现象，当不观察或相机不曝光时，一定要关闭反射照明遮光器。

基本方案 4　相差显微镜术的校准

相差显微镜术常用来显示非吸光性的透明生物标本的反差。Zernike 于 1942 年发明了该技术，并因其卓越贡献而获得诺贝尔奖（Zernike　1942，1958）。本单元后所列的参考文献描述了相差原理，并出色的介绍了显微镜成像、图像清晰度及图像反差的波动光学方面的基础知识。

相差显微镜是一种附带特殊相差物镜的亮视野光学显微镜，该相差物镜（图 5.1.5）上带有一个相位板或相环，另用一聚光器环取代了聚光器光阑。由于必须选择用于不同物镜的聚光器环，所以常把聚光器环装在聚光器转动器上。常用标准 Kohler 照明法将显微镜光学系统调整为亮视野标本照明模式，不过不用调整聚光器光阑。相反，要选用适当的聚光器环并加以调整。在物镜镜筒内，现代相差物镜在后聚焦面上装有带相环的相位板，该相环能吸收并通过穿过它的光相，其波长为通过剩余物镜孔的光波长的 1/4。在聚光器转换器上，每个相差物镜都有一相应的聚光器环，该环与物镜的

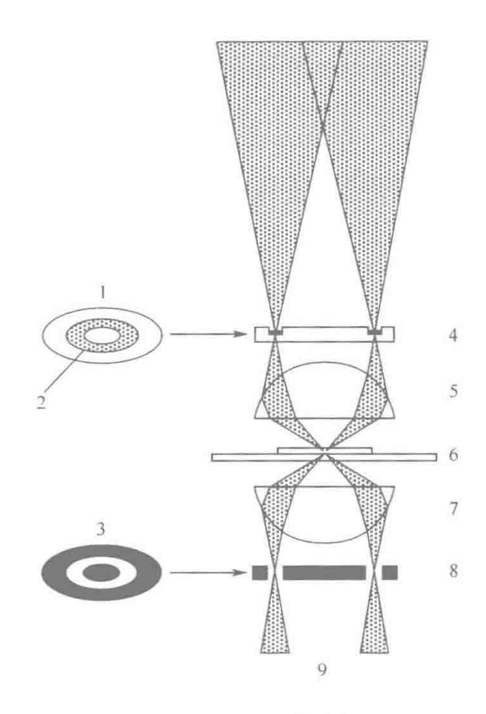


图 5.1.5　通过显微镜的聚光镜环（condenser annulus）与物镜相环（objective phase ring）的照明光路调整为相差显微镜术模式

1. 相位板　2. 相环　3. 聚光器环　4. 物镜后焦平面　5. 物镜镜头　6. 标本　7. 聚光镜镜头　8. 聚光器转动装置　9. 照明光

相环大小相当。恰当选择和调整聚光器环后，能通过该环的光也将通过物镜的相环。标本散射的光主要通过相环外的物镜孔。薄透明标本的散射光比未散射照明光延迟 1/4 波长；物镜相环引起的散射光与照明光之间的另外 1/4 波长延迟，致使散射光与照明光发生 180°异相。它们在像平面上的相消性相互干扰产生了典型的生物标本相差图像的微细结构的“暗”反差。

由于聚光镜环和相环降低了背景光强度，当放大倍数较大时，亮照明器（如 100W 石英-卤素照明器）是必需的（原因在于图像亮度降低 1/放大倍数^2）。对于活细胞来说，应采用热反射滤光片和绿光滤光片。

要检测物镜相环及相应的聚光镜环，就应先从显微镜上移去低倍和中倍相差接物镜以及相差接聚光镜。在后部末端观察物镜内的相环（相位板）。相环位于物镜的后焦平面上，相环直径常为物镜孔的 2/3。注意相环位于物镜内且可观察到，原因在于它能吸收光线。在聚光器转动器上安装与每个物镜相应的聚光器环，聚光器环位于聚光器光阑平面，即聚光器的前聚焦面。注意聚光器转动器上相应的聚光器环直径随物镜数值孔径的增大而增大。来自聚光环的聚光器照明数值孔径与相应物镜相环数值孔径相匹配。

将聚光镜重新放回显微镜，并用白光照明，将一薄纸放在聚光器顶部观察照明光锥，注意为环形。将低倍物镜转至 40×物镜时应更换聚光镜环，注意数值孔径或照明角度变大。来自聚光器光阑平面中轴的照明光点将产生通过标本的更大孔径的光束。

1. 用低倍相差接物镜（10×或 16×）将显微镜调整为亮视野 Kohler 照明模式，制备口腔上皮细胞标本。

   将显微镜调整为相差模式及 DIC 模式时，口腔上皮细胞标本是非常好的透明检测标本。cheek cell 是透明的且仅在亮视场照明时几乎看不到。为找到亮视场中的焦平面，应首先关闭聚光器光阑，寻找制作过程中气泡的边缘。因为边缘散射更多的光而使其在图像中较暗。

2. 通过将聚光器转动器转至合适的位置，即聚光器环与物镜内相环匹配的位置，来调整聚光器环及相环。用望远镜、眼睛或贝特朗透镜来观察物镜后孔。转动聚光器转动器时，注意在物镜后焦平面上，为不同数值孔径的物镜设计的不同直径的聚光器环的图像；用物镜相环或许不能恰当地校准正确的聚光镜环。

3. 用聚光器上的调节旋钮（必要时应同时使用特殊工具）在 x-y 平面移动聚光器环，

以调节物镜相环。

注意：相环比正确的聚光镜环图像略大。重要的是聚光镜环图像要在相环内，但若聚光镜环图像稍微有一点偏离中心则无关紧要。

4. 调节物镜相环和聚光器环后，观察标本，并适当调节视场光阑的焦点及中心。

   注意：如果相环和聚光器环调节稍有偏差（稍微转动聚光器转动器），背景光强度就会增加。原因在于相环可吸收较多的照明光。未散射照明光强度接近于标本散射光强度，标本散射的光通过相环外的物镜孔。观察标本图像时最小化背景光强度，也可用来校准聚光器环及其相应的相环，或在背景光强度最小化时，通过镜筒下观察来校准。

5. 转至 40×相差接物镜，再转至 60×或 100×高倍相差接物镜，重复步骤 1～4。放大倍数增加后应提高光强度。应该可以看到细胞的表面轮廓。注意细胞边缘不连续处的“相晕”，“相晕”是高清晰成像时限制传统相差的一个因素。

支持方案　显微镜光学部件的维护及清洗

保持显微镜光学部件的清洁对于高质量成像非常重要。显微镜上或显微镜内的灰尘、指印、多余浸油或封固剂会降低相差及分辨率。DIC 对于镜头表面的污染物及划痕尤为敏感。保持显微镜清洁的步骤如下：

1. 不使用显微镜时，要将其盖起来。
2. 确保塞紧镜头转换器上所有的孔、筒及空洞部位。
3. 从显微镜取下物镜后，应将其存放于螺口容器内；显微镜附件，如聚光器及校准器，应放在塑料袋或塑料盒内；玻片及盖玻片应盖起来。
4. 小心盐水、腐蚀性液体及所有溶剂。
5. 清洗镜头表面时，应避免镜头接触任何东西（可能的话，甚至要避免接触镜纸）。

   重要警告：杜绝使用拭镜纸（Kimwipe）及商品面巾纸，它们可能含有部分硅藻化（玻璃）填充物，用面巾纸（Kleenex）擦一下就会损坏物镜。

6. 用无油（乙醚清洗过的）骆驼毛刷子刷去灰尘，或用低速的洁净空气气流吹掉灰尘。
7. 用含少量去污剂（如 Kodak Photoflow 溶液）的蒸馏水去除水溶性（或现代浸油）污染物。
8. 用高质量镜纸从物镜或聚光镜头前部拉过以去除大部分浸油。

   重要警告：不要擦。镜纸的任何部位最多只能与镜头接触一次，这样可避免从镜头上去除的灰尘及污染物再次污染镜头或者划擦镜头。简单的方法就是以“Z”字形方向或平行从镜头表面拉过镜纸。

9. 在一对折的镜纸上滴几滴溶剂，用来清洗物镜。从镜头表面拉过镜纸，使溶剂迅速流入镜头凹陷处并呈圆形聚集在一起。在每次这样的操作中，镜纸的干燥部分最后从镜头表面拉过。必要时重复该步骤。

   由于镜头是凹陷的，所以溶剂接触镜头，但镜纸并不接触。第一次使用蒸馏水稀释的 1% Kodak Photoflow 溶液，用该溶液去除大部分浸油及水溶性物质，然后用少量脂溶性试剂如乙醚或二甲苯去除表面的全部浸油。不要将透镜浸入溶剂，以免

损坏镀膜。

10. 将棉签浸入清洗液中，然后晃动棉签，甩掉多余的清洗液，再用来清洗凹陷的干式物镜镜头前成分或用来去除顽固污渍，在镜头表面转动顶端棉花来清洗物镜。同样，第一次使用蒸馏水稀释的 1%Kodak Photoflow 溶液，用该溶液去除大部分浸油及水溶性物质，然后用少量脂溶性试剂如乙醚或二甲苯去除表面的全部浸油。
11. 用去污剂溶液或乙醇（不用二甲苯）来清洗目镜表面。

参考文献：Herman and Jacobson，1990；Keller，1998；Taylor and Wang，1989；Zernicke，1942，1958.

撰稿人：Edward D. Salmon and Julie C. Canman

（冯　若　张钦宪 译）

单元 5.2　荧光显微镜术

可发荧光是某些分子的特性，这些分子可吸收特定波长（λ）的能量，一段时间（即荧光寿命）后，再释放部分所吸收的能量（往往比吸收的能量少）。分子以光的形式吸收能量，而仅在一定波长以荧光形式释放能量，这是特定分子的特性。吸收波长最大值（与能级相应）与发射波长最大值之间的差值称为斯托克（Stokes）位移。每个荧光分子都有自己特征性的、明确的吸收及发射能级（如激发光谱与发射光谱）。这一现象联合另一现象，即在激发态寿命内许多因素可影响荧光团的发射，使得我们利用荧光的特异性、量及环境的敏感性、高瞬时清晰度来检测显微镜下结构。为此，荧光显微镜应允许激发能量以特定能级的光的形式传递至标本，且与特定能级相应的波长应与荧光标本的最大吸收谱匹配；该显微镜还要能分离较弱的发射荧光与较亮的激发光，以便于观察。

荧光显微镜光学系统

荧光显微镜必须有以下四种功能：①给标本提供合适波长的激发光；②分离激发光与发射的荧光；③尽可能多的收集荧光团所发出的荧光；④可以观察标本的微细结构。

荧光显微镜的设计应具备上述四种功能。激发光光源与波长选择装置可进行合适的激发光波长选择；激发光可透过显微镜物镜传递至标本；双色分束镜可用来分离激发光与发射的荧光；双色分束镜具有这一特性，即能反射特定波长以下的光，但又允许该特定波长以上的光毫无干扰地通过该镜。物镜镜头应尽可能多地收集来自样本发射的荧光，还应提供合适的放大倍数且可观察标本的微细结构。

最常用的照明系统是由 Ploem 发明的，称为 Ploem 照明、入射照明或反射照明。对于反射照明来说，双色分束镜将激发光反射到物镜后孔，物镜相当于聚光镜将激发光聚焦在标本上。物镜收集部分激发荧光（收集的量由物镜的数值孔径决定），所收集的荧光穿过双色分束镜到达眼睛或到达检测仪。利用斯托克位移及双色分束镜的上述特性可以分离激发光与发射的荧光。

荧光显微镜部件

激发光源

有多种可用于荧光显微镜的激发光源。光源的选择取决于所用的荧光探针。由于许多可用的荧光团（见表 A.2D.1）需要可见光谱绿/蓝段的激发光，所以常使用汞灯、氙灯或者氙气汞灯，也可使用激光。根据特定实验需要的波长和激发能量多少，选择合适的光源，而每种光源都有自己的优点。例如，汞灯能发射不连续波长的能量（如365nm、400nm、440nm、546nm 及 580nm），这种光源适用于笼锁化合物的释放如紫外线激发活细胞内化学性“笼锁”（惰性）分子［如 Ca^{2+} 和 1,4,5-三磷酸肌醇（IP_3）］，也可用于激发 DAPI（4′,6-二脒基-2-苯基吲哚）、荧光素及罗丹明荧光团；相反，氙灯光谱则从紫外到远红外均匀过渡，这种光源适用于钙敏感染料 Fura-2。卤化金属灯泡产生的光谱与汞弧灯产生的光谱相同，不过每单位面积的卤化金属产生的能量比汞弧灯少；但 150W 卤化金属灯泡的寿命是汞弧灯的 5 倍（1000h 比 200h），氙灯（75W）寿命约为 400h。这里所提供的寿命为估计值，灯泡的寿命取决于灯泡打开状态的总时间及灯泡的开关次数。第一次使用或第一次点亮时，会出现火花闪烁或漂忽，首先进行 2h 的持续微燃或者 10min 的预热可使火花闪烁或漂忽现象降低到最小。如果灯泡已关掉，则至少 20min 后才能再次打开灯泡使用。

激光器（受激辐射式光频放大器）提供极高能量的单色光，它可用于连续波或脉冲式操作。激光为连续的单色光（尽管一个激光器可产生多种波长的光），也是偏振光（在一个平面上传播）。脉冲激光器越来越广泛地应用于荧光显微镜术，尤其是双光子激发显微镜术（TPEM）与完整细胞或组织内荧光寿命的二维或三维检测。显微镜术中使用激光器时，需要关注的是光路中光学部件表面的灰尘及污染物产生的散射和衍射潜能，用多模光纤或液态光管可消除这种现象。

光漂白

光漂白或“褪色”指标本照明引起的荧光强度损失。光漂白降低了荧光信号，因此也降低了显微镜图像的信噪比。荧光显微镜术中光漂白的主要类型为光力学型光漂白，它与荧光团和光及氧气之间的相互作用有关。在激发状态下，荧光分子能与附近的氧分子（O_2）相互作用，引起荧光团的氧化及荧光的丢失。处于激发态的荧光团可与氧分子发生碰撞，并“敏化”产物单态氧。单态氧活性很高，可与荧光团相互作用并引起褪色。一定条件下产生的光漂白或褪色程度取决于氧分子的浓度、激发态荧光寿命（寿命越长，与氧分子相互作用的概率越大）以及荧光团、氧分子与其他细胞成分之间的距离。

克服光漂白的方法是减少曝光时间或降低激发能量。然而，这些方法也会减弱检测信号。分子溶液或细胞悬液也要进行去氧化处理，但是活细胞和活组织不适于进行去氧化处理。固定标本时可加入抗萃灭剂，如 *n*-丙基没食子酸盐或其他商业试剂；也可用单态氧萃灭剂如组氨酸、二苯基异苯异呋喃或者藏花酸（一种水溶性类胡萝卜素）。使用计算机控制的电子遮光器，使其仅在收集实验数据时打开，这样可延长滤镜寿命，且可将标本暴露于有害辐射的概率减至最小。

通常会不惜一切代价来避免光漂白，不过有一种实验技术可利用光漂白现象检测荧光分子的横向传播迁移率，这种技术称为光漂白后荧光恢复（FRAP）。其原理是激光器产生的短、强脉冲引起荧光分子小面积的不可逆光漂白，并观察漂白区域的荧光重现，未漂白区域的荧光扩散到漂白区域而引起荧光重现。这一过程的动力学与荧光材料的横向传播迁移率相关。

波长选择装置

对于荧光显微镜来说，激发滤色镜可分离汞弧灯、氙弧灯或激光器产生的特定能级（波长）的激发光，并由双色分束镜将其反射到标本上。发射的荧光要经过截止滤光片或吸收滤光片才能到达观测部件，而这些滤片可阻止所有低于设定值波长的光。

滤光片可由多种物质构成，如吸收玻璃（包括明胶）或薄膜镀层。薄膜镀层为金属类（见于全反光镜和中密度滤光镜）或为干涉膜（见于干涉滤光片）。每家显微镜厂商都有几种激发滤色镜/双色分束镜/吸收滤光片组合，组合滤光片的选择取决于所采用的荧光染料种类。

根据其透射性来描述某种滤光片。短波通滤光片只允许小于特定波长的光通过，而大于该波长的光则不能通过；长波通滤光片只允许大于特定波长的光通过，而小于该波长的光则不能通过。短波通滤光片和长波通滤光片都是以波长命名的，而该波长的透射光为最大值的 50%。

滤光片也只能透射特定范围内波长的光波（干涉滤光片或带通滤光片）。宽带通滤光片和窄带通滤光片都有。滤光片能透过光的波长范围越小，那么它区别混合物中各个荧光团的能力就越强（即反差越大）；然而，区别能力越强，荧光强度就越弱。宽带滤光片产生的信号较强但反差较小（反差就是指区别特异性和非特异性荧光的能力或指在不止一个的荧光团共存时区别各个荧光团的能力）。这些滤光片以它们的中心波长（达到 50% 透射峰值时波长的数学平均值）和达到 50% 峰值透射率（半峰全宽，或 FWHM）透光时光的波长范围（带宽）命名。例如，BP490/30 是一种干涉滤光片，它的最大透射值为 490nm（用于激发荧光素）；它能透过波长为 475～505nm 的光。短波通滤光片和长波通滤光片能叠放在一起联合使用，相当于特定的带通滤光镜。双色分束镜将较短波长的激发光反射到标本上，而允许发射的长波荧光通过并传至检测仪，最好有 90% 以上的激发光被反射且有 90% 以上的发射光通过。依据反射到标本上光的最大波长来选择双色分束镜。

通常一个荧光标本上可见一个以上的荧光团。为了在不受其他荧光团干扰的情况下单独观察某一种荧光团，显微镜必须安装组合式激发滤色片/双色分束镜/吸收滤光片，最好每种滤光片都与各自的荧光团匹配。当然这种设置不能同时观察所有荧光团。为了同时观察一个以上的荧光团，可安装多种不同带宽的单个滤光片。除了滤光片，单色仪及电子-光学仪器也可用作波长选择装置。

荧光素及罗丹明是荧光显微镜术最常用的两种荧光团。经典的荧光素及罗丹明滤光装置的组装应基于以下各方面的考虑。荧光素的吸收波长最大为 490nm，发射波长最大为 525nm；罗丹明的吸收波长最大为 550nm，发射波长最大为 580nm。因此安装两种滤光装置时，应使恰当的激发波长（490nm 和 550nm）能够到达标本，也应在到达

检测仪前将发射荧光与激发光及其他散射光分离。用汞灯，一个激发干涉滤光器置于光路中—由一个适于荧光素的450～490nm滤光片和一个适于罗丹明的546/12nm滤光片组成—来选择这两种探针合适的激发波长。激发光穿过滤光器后，到达双色分束镜（DM）—由适于荧光素的DM510nm的镜子和适于罗丹明的DM580nm的镜子组成，该双色镜分别将波长低于510nm及580nm的光反射到物镜后焦平面，继而到达标本。用发射滤光器分离荧光素与罗丹明的发射荧光，发射滤光器由长波通（LP）520nm及LP590nm的滤光片组成，这些滤光片让我们可以在同一个标本上单独观察荧光素和罗丹明，不过在以下情况下则不可以（事实上这些情况是会发生的）：罗丹明的激发光波长与荧光素的激发波长重叠，荧光素的一小段发射光谱与罗丹明的部分发射光谱重叠。克服这一问题的方法是用发射滤光器目测，并且特异性分离荧光素发射的荧光与罗丹明发射的荧光，发射滤光器由适于荧光素的515～565nm滤光片及适于罗丹明的LP610nm滤光片组成。

还有其他类型的滤光器也可用于荧光显微镜术，如热滤光片和中密度滤光片。热滤光片用于保护激发滤光片和检测仪免受红外辐射，将它置于光源前可减少传至激发干涉滤光片的热能，也可降低紫外光激发强度；中密度滤光器均匀地降低激发光所有波长的强度，常用于降低激发光强度以避免荧光的光漂白现象，也可避免对活细胞或活组织造成的光毒性。中密度滤光片应放在热滤光片与激发滤光器之间。

物镜

在荧光显微镜术中，物镜具有聚光器、放大镜及发射荧光收集仪的功能；在表面荧光显微镜术中，反射光物镜得到了改进，特点在于其特殊的镀膜玻璃表面（“抗反射膜”），这可避免光学系统的反射。现在使用的大多数物镜（若不是全部的话）都是无穷远焦点物镜。对于无穷远焦点物镜来说，来自标本任何一点的光束在物镜与目镜之间都是平行的。无穷远焦点物镜的优点在于它对光路中的其他成分不敏感（如滤光片）。

选择荧光显微镜的物镜时，重要的是所选物镜要有不同的放大倍数、采光能力（数值孔径）、透过光的波长、所需的浸入介质，还要有不同的改进后的特殊用途。表5.2.1列出了目前一些物镜的型号及其特殊性能。

表 5.2.1　物镜透射镜头特性[a]

透镜	特性	用途
平场消色差透镜	平场；消色差	短工作距离常规荧光
Ultrafluar[b]	宽光谱透射率（200～700nm）	Fura-2负载法钙检测
石英透镜	紫外透射率	紫外（UV）荧光
多介质浸物镜	含或不含载玻片时使用	放大倍数小，NA大
水浸物镜	NA大	活细胞或活组织的生理学研究
消色差透镜	价格低；部分消色差	相差显微镜术
Plan/Epiplan[b]	高相差；平场；长工作距离	显微照相术
Plan/Epiplan Neofluar[b]	平场；宽幅可见光谱内校正球面像差及色差	Fura-2负载法钙检测

a. 缩写：NA（数值孔径）。

b. 代表Carl Zeiss公司的商标如Ultrafluar、Neofluar及Epiplan。

以下考虑可使图像亮度最佳化：

1. 用波长合适（依荧光团而定）且能量足够（但不引起光漂白）的激发光照射标本。
2. 观察荧光时，不要受任何激发光的污染。
3. 光源必须在较窄的光谱范围内提供较多的激发能量。
4. 选用的滤光片应透射需要的波长，阻断不需要的波长。
5. 物镜应有较高的透射率，从紫外光到大部分可见光谱
6. 选用最大 NA 的物镜。一个好的经验就是，如果选用的物镜孔径大 2 倍，那么它收集的荧光就多 4 倍。
7. 选用折射率合适的（$n=1.51$）、非自发荧光性的、不含 PCB 的浸油，来消除表面反射造成的光丢失。
8. 显微镜的所有光学部件都不可产生自发荧光。自发荧光会增强背景亮度，降低图像反差。
9. 物镜镜头一定要清洁。
10. 选用合适厚度（0.17mm）的盖玻片。对于 NA＞0.7 的物镜来说，盖玻片厚度在 0.17±0.01mm 范围内有所浮动，依然可呈现高清晰的图像；当物镜 0.7＞NA＞0.3 时，盖玻片厚度在（0.17±0.03）mm 范围内有所浮动，依然可呈现高清晰的图像。
11. 浸油层一定要避免气泡。
12. 应关闭视场光阑以提高反差。

数字化暗室

长期以来，显微镜下图像的照片一直是传播显微镜资料较好的手段。过去是以胶卷为媒介来记录图像。然而，由于捕获及显示图像时计算机的应用以及因特网的普及，以计算机为基础的图像分析系统以及永久性硬拷贝显微镜图像的显示程序也得到了迅猛发展。数字化成像技术在很大程度上提高了图像捕获及数据显示速度。相对胶卷来说，这是个很大的进步。不过使用以计算机为基础的图像分析系统以及显示软件时，有现成的修改图像信息的方法，此时必须注意最终的图像一定要保持原始数据。电子图像显示也存在其他问题例如，图像捕获软件的数据格式与显示格式不兼容；电子成分本身也可造成原始图像信息的扭曲。

以下内容讲述了用于荧光显微镜术的经典数字化暗室的总体设计。在成像焦平面的显微镜孔上连接一个一维或二维检测仪（如各种相机、光电倍增管或者光电二极管阵）。显微镜所成的像由检测仪显示并传送至计算机，这就要求计算机应有特殊的硬件接收来自相机的图像，还要有较大的快速存取 RAM 或硬盘空间来存储图像。由于图像携带的信息较多（需要较大的存储空间），所以可选用较多的存储媒介来存储显微镜图像，之后可以数字化格式显示并进行数字化处理。这些设备包括光盘存储器（OMDR）、计算机软盘、Zip 驱动器、Jazz 驱动器、CD-ROM 盘、硬盘驱动器、激光镭射盘以及光盘。

如果计算机存储器或硬盘上装有图像相关程序（如 Image-I、Photoshop、Adobe Illustrator、Designer、Corel Draw），就可以用这些程序制作一张能达到出版质量的图

片。这些程序有很多功能，其中包括锐化或钝化图像、去除背景和/或非特异性显示、伪彩色、图像剪辑以及标记图像。注意这些程序相关的要求，或许这些程序输入/输出的文件格式与其他图像显示程序不兼容。总的来说，如果软件允许操作者灵活定义参数且有多种数据与文件格式的话，那么该图像处理软件是最有效、最有用的工具。建立数字化数据系统用于以计算机为基础的统一格式处理是非常有用的，该格式应很容易被目前多种图像分析/处理软件识别。标记图像文件格式（TIFF）就是一种通用文件格式。显微镜图像显示软件的其他重要要求包括位图操作能力，它可调节打印彩图的颜色使打印的彩图颜色与计算机显示屏上的色彩一致。需打印彩图时，另一要求的重要功能就是能以两种 CMYK 和 RGB 格式打印。如果彩色打印时，软件使用 PostScript 驱动，那么一定要确保 PostScript 色彩翻译器启用全能打印。

一旦计算机图像制作完成，就可用多种技术制作一个能达到出版质量的硬拷贝。这包括照片印刷和彩色复印机，以及与计算机配套的各种型号的打印机，如彩色或黑白激光打印机、喷墨式打印机（物美价廉）和染料升华打印机（它需要特殊的纸，较清晰，色彩再现较好）。也可选择 LCD 投影仪，它可直接显示计算机获取/处理的图像。

参考文献：Abramowitz，1993；Herman，1998

撰稿人：Brian Herman

（冯　若　张钦宪 译）

单元 5.3　免疫荧光染色

本单元阐述这种较好的、广泛用于细胞内蛋白质定位的免疫荧光技术，该技术可作为电子显微镜免疫定位技术以及亚细胞分离（见第 3 章）的补充技术。

基本方案　培养细胞的免疫荧光标记

以下是用间接免疫荧光定位蛋白质或其他抗原的基本“通用”方法。

注意：采用相应的消毒技术保证所有要接触活细胞的试剂和器械必须无菌。必须在有一定湿度的37℃，含5% CO_2的培养箱内培养，有特殊要求者除外。一些培养基（如DMEM）要求变动 CO_2浓度以保持其 pH 为 7.4。

材料（带√项见附录 1）

感兴趣的细胞

√ 2%（v/v）甲醛

√ PBS，pH7.4

√ PBS（pH7.4）/10%FBS

√ 在PBS（pH7.4）/10%（v/v）FBS 中加入 0.1%（w/v）皂苷（新鲜加入 10%储存液）

一抗（纯化至免疫印迹法只能识别一种感兴趣的蛋白质；单元 4.3 和单元 7.7）

对照：0.1%（w/v）皂苷/ PBS /FBS 或（如果有的话）免疫前血清（如果用兔多克隆抗体）或加入过量抗原的一抗

二抗：抗产生一抗的动物物种的 IgG 并与荧光团偶联

√封片剂

直径为 10cm 的培养皿

12mm 1 号圆形玻璃盖玻片，经过高压蒸汽灭菌或浸入 70%乙醇灭菌，或者 L-多聚赖氨酸包被的盖玻片

12 孔培养板

150mm 培养皿

Watchmaker's 镊子

显微镜玻片

指甲油

装有 63×油浸物镜的荧光显微镜

1. 对于贴壁细胞来说，实验前 1～2 天用胰蛋白酶消化细胞，并将其种到 10cm 培养皿中，每个培养皿中都有 15～20 个约 12mm 的 1 号玻璃盖玻片，确保实验当天细胞汇合度为 20%～50%。

   另一种情况就是，依据厂家说明用血细胞分离器让细胞贴附在盖玻片上。

2. 实验当天，将每个玻片上贴附的细胞分别移至 12 孔培养板的各孔中，每个孔内有 1ml 培养基。使细胞符合实验条件。如果用的是非贴壁细胞，先处理细胞，然后将 10～20μl 细胞悬液滴至 L-多聚赖氨酸包被的盖玻片上，静置 10min。

3. 吸出培养基，每孔中分别加入 2%甲醛 1ml。室温固定细胞 10min，然后再吸出甲醛固定液。

   恰当的细胞固定方法可维持抗原在细胞内的分布并保持细胞形态。对于每种抗体及每类细胞要分别确定适当的固定条件。关于固定及抗体标记特异性的探讨请参阅 Griffiths (1993)，关于替换固定液的探讨请参阅 MCCaffery 和 Farquhar (1995)。

4. 加 1ml PBS，pH7.4，放置 5min，然后吸出；再重复一次。在固定后的盖玻片上加 1ml PBS/10%FBS，放置 10～20min。操作的任何时候都不能让细胞干燥。

5. 在 1.5ml 的微型离心管内，用含 0.1%皂甙的 PBS /10% FBS 溶液稀释一抗（通常对于亲和纯化后的抗体所需浓度为 1～10μg/ml，兔抗血清为 1∶100～1∶1000）。

   最初鉴定时，最好先检测一抗及二抗的稀释范围。

   皂苷的替代品包括 0.2%～0.5%的 Triton X-100 或 SDS。

6. 对照组准备。室温下，以最大速度离心抗体稀释液和对照溶液，从沉淀物上吸出抗体溶液。

7. 在 150mm 的培养皿底上放一张 10cm×10cm 的封口膜。模仿孵育盖玻片的 12 孔培养板的设计绘制网格图，并标出每个盖玻片在封口膜上的适当位置。

8. 在每个有编号的部分加一滴合适的一抗 25μl，用 Watchmaker's 镊子小心从 12 孔培养板取出每个盖玻片（注意分清楚哪个面上有细胞），用拭镜纸的边缘吸去多余的液体，再将盖玻片置于 25μl 的一抗溶液滴内，确保细胞面向下。盖上培养皿盖，室温

孵育 1h。

有时需要更长的孵育时间（意味着缺乏特异性染色）才能达到满意的标记效果，或者为方便起见可孵育培养皿超过 1h。如果孵育时间较长的话，应在培养皿内放些湿拭镜纸以保持空气潮湿。必要时，孵育时间可延至过夜，4℃。

9. 小心取出盖玻片，翻动盖玻片使细胞面朝上，再将其放入 12 孔培养板中。加 1ml PBS/FBS，放置 5min，再吸出溶液；重复两次以上。
10. 用含 0.1%皂苷的 PBS /10% FBS 溶液稀释荧光团标记的二抗（商品建议稀释比通常为 1∶100～1∶500）。混匀后离心以去除沉淀，方法同步骤 6。
11. 准备一孵育盒，见步骤 7。在每个有编号的部分加一滴合适的二抗 25μl，并将盖玻片置于二抗溶液滴内，方法同步骤 8。盖上培养皿盖，避光存放（如铝箔，放在抽屉里），室温孵育 1h。

如果背景太浅的话，那么采用荧光双夹心技术或许可以增强信号（如先用 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 孵育，再用 FITC 标记的驴抗羊 IgG 孵育）。注意二抗标记物不要改变，抗体也不能有交叉反应。

12. 洗盖玻片，方法同步骤 9。最后吸去 PBS/FBS 后，加 1ml PBS。
13. 标记载玻片，并在上面滴一滴封片剂。从孔中取出盖玻片，用拭镜纸的边缘缓慢吸去多余的液体，然后细胞面朝下，将盖玻片置于封片剂液滴中。用纸巾轻轻除去盖玻片上的封片剂，再在边缘涂上指甲油，用来封闭盖玻片边缘。干燥。4℃下，于暗处可保存半年到 1 年。
14. 用 63×油浸物镜，在荧光显微镜下观察（单元 5.2）。通过与对照组相比，确定哪里是非特异性染色。如果背景染色太重，则要再次稀释或更换二抗（或供应商）、供体、荧光团或吸附试剂（如替换 PBS/FBS）。

免疫前兔血清的染色效果应与单独使用二抗的染色效果相同。如果有免疫抗原的话，可以加至抗体稀释液中，它可去除荧光背景。验证特异性染色可通过不表达感兴趣蛋白质的细胞类型内染色的缺乏来证明，此外瞬时转染可使蛋白质过表达的细胞内特异性标记增强。

15. 可能的话，用感兴趣蛋白质的不同抗体单独确认定位。

参考文献：Coons，1961；Griffiths，1993

撰稿人：Julie G. Donaldson

（冯　若　张钦宪 译）

单元 5.4　荧光染料及荧光脂类衍生物标记细胞器

本单元阐述用荧光染料及荧光标记的脂类衍生物标记三种细胞器［内质网（ER）、高尔基复合体及线粒体］的方法。这些方法的优缺点可参见表 5.4.1。

表 5.4.1 细胞器荧光染色的优缺点

缺点	可能原因和/或解决方案
内质网	
染色太重，看不清网状结构	这意味着相对于光学显微镜的分辨率来说，ER 和/或其他细胞器的着色太重。如果内质网膜之间或内质网膜与其他细胞器之间的距离小于 0.5 μm 左右，则光学显微镜术就很难分辨出清晰的图像。如果内质网有三维结构，则重叠的膜也会使问题变得复杂。有时，使用 100×镜头或共聚焦显微镜会有所帮助。有时可能需要更换细胞类型或采用其他方法来观察内质网，如电子显微镜术
内质网囊泡形成	一个可能的原因是未固定好。甲醛固定常可引起内质网囊泡形成。用戊二醛的新鲜储存液固定会有所改善。囊泡形成的另一原因在于固定缓冲液，需确保其张力及 pH 处于生理水平。对于固定细胞，用另一种缓冲液（100mmol/L 蔗糖及 100mmol/L 二甲胂酸钠，pH7.4）代替 PBS 会好些。另一原因是处理细胞过程中细胞干燥了，所以整个过程中保持细胞湿润是非常重要的
网状结构拖尾现象	可能由于提取膜用的有机溶剂或去污剂以及染料着色造成。不要用指甲油封片，因为指甲油内的有机溶剂会造成拖尾
网结构模糊，扭曲	通常是显微镜光学系统的问题造成的。确保盖玻片上浸油内不含水。检查物品是否干燥，盖玻片是否碎裂，以及物镜上是否有残余杂物
看不到网状结构	在一种细胞类型，即鱼色素细胞中，$DiOC_6$（3）不能使其内质网着色，且呈现弥散的染色背景（M. MCNiven，pers. comm.）。这确实很奇怪，因为 $DiOC_6$（3）可以成功地使很多较高级的脊椎动物、无脊椎动物及单细胞生物着色。可能是由于鱼色素细胞的内质网的脂类成分阻止 $DiOC_6$（3）进入双层膜
高尔基复合体	
荧光脂类标记背景太高	最初标记细胞时，用低浓度荧光脂类（$<5\mu$mol/L）标记
没有特异性标记	检查荧光脂类储存液，注意是否正确配制，是否过期。看看荧光脂类在 4℃和（或）37℃下孵育时间是否够长，在 4℃和（或）37℃下孵育时间较长有助于产生特异性荧光
非特异性标记太多	降低加入细胞的荧光脂类浓度。转至 37℃后，需要更长的时间才能观察。确保细胞为非自发性荧光型细胞（即未标记细胞显示与非特异性标记相同的荧光）。由于用 BODIPY-Cer 标记，若用罗丹明匹配的光学部件观察，则只显示 BODIPY-Cer 激发物发出的荧光
特异性染色太弱	提高加入细胞的荧光脂类浓度，4℃孵育更长时间
观察拍摄过程中，细胞聚集，变得不正常	用逐渐变弱的光观察拍摄细胞。仅用较短的时间拍摄观察细胞。用更低的荧光脂类浓度来标记细胞
光漂白导致荧光消失	在成像前用相光学部件找到细胞并聚焦，最大限度地降低光漂白程度。用逐渐变弱的光拍摄观察细胞，且用尽量短的时间来观察细胞。最好使用检测弱光的成像系统，因为用较少的光照射标本，可降低光漂白程度。选用 BODIPY-Cer，而不用 NBD-Cer，因为前者的光漂白速度比后者慢

续表

缺点	可能原因和/或解决方案
线粒体	
线粒体标记较弱	这说明要提高染液浓度，延长孵育时间。如果这样还不行的话，那可能是线粒体膜电位较低造成的。由此推断，也可能是由于细胞不正常造成的
同线粒体肿胀标记线粒体时也标记了ER（弥散于整个细胞的网状结构）；细胞坏死	这说明细胞内染料太多，降低染液浓度即可

基本方案1　固定细胞的内质网染色

处理生长在盖玻片上的细胞，方法与免疫荧光技术中的步骤相似（单元5.3），但有两点不同。第一点是不能接触去污剂、有机溶剂及指甲油，因为它们含$DiOC_6(3)$；第二点是时间要短得多。参见活细胞相关技术的辅助方案。

材料（带√项见附录1）

√固定液：用PBS（见附录）配制0.25%的戊二醛，PBS的商品储存液浓度为7%～70%（4℃，可存放1周）

感兴趣的细胞，生长在盖玻片上

√ 25 μg/ml $DiOC_6(3)$工作液

√磷酸盐缓冲液（PBS）

硅树脂高度真空油脂（Silicone high-vacuum grease）

小培养皿

Watchmaker's镊子

√硅胶盒（silicon rubber chamber）

荧光显微镜，装有荧光素和罗丹明滤片及63×或100×的油浸物镜（单元5.2）

1. 在一空的小培养皿内放入一些固定液。用（Watchmaker's）镊子将一长有细胞的盖玻片移至固定液中，3～5min。从固定液中取出，细胞面朝上置于一张封口膜上。用巴斯德吸管吸去多余的固定液，但不要让盖玻片干燥，应保持一定的湿度。
2. 滴加足量的25 μg/ml $DiOC_6(3)$工作液覆盖盖玻片（常为100μl）。10s后，用巴斯德吸管吸去$DiOC_6(3)$溶液，再用足量的PBS覆盖盖玻片。
3. 用最少量的硅树脂高度真空油脂涂于硅胶盒的两个面（短时间观察，可不涂抹）。将涂抹后的硅胶盒紧紧地压在显微镜载玻片上，避免气泡产生。盒内装满$DiOC_6$（3）工作液，再将盖玻片细胞面朝下置于硅胶盒上。轻轻向下按压盖玻片，使载玻片与硅胶接触，让盖玻片黏在盒上达到封闭的效果（图5.4.1）。用拭镜纸吸干多余的液体。

有一种替代方法（不用硅胶盒）是将盖玻片细胞面朝下，直接轻轻地置于显微镜

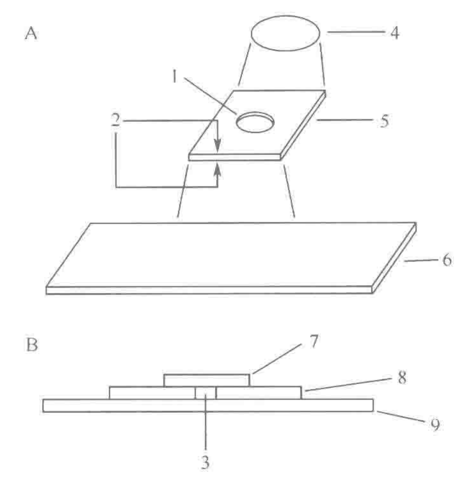


图 5.4.1 显微镜玻片与硅胶盒

(A) 装配；(B) 横切面的侧面观

1. 0.65cm 的孔 2. 油脂（涂于双面） 3. 装满 $DiOC_6$（3）工作液的孔 4. 盖玻片（细胞面朝下） 5. 硅胶板（2.5cm×2.5cm） 6. 载玻片 7. 盖玻片 8. 硅胶板 9. 载玻片

载玻片上，并使产生气泡的概率最小化。小心吸干盖玻片边缘，尤其是盖玻片上方的液体。短时间观察时，不用封片。不要让显微镜浸油进入盖玻片下面。另外，注意盖玻片先从边缘部开始变干，而干燥处的细胞不适于观察。需要封片的话，要选用石蜡或 Valap（单元 15.1），不要选用指甲油，因为指甲油的有机溶剂中含有染料。

4. 用装有荧光素滤片及 63×或 100×的油浸物镜的荧光显微镜观察细胞（单元 5.2）。

   染色后 10～20min 内观察效果最好。之后，染料开始向溶酶体聚集。长时间以后，戊二醛的自发性荧光开始使染色变得模糊。

备择方案　活细胞内内质网染色

$DiOC_6$（3）也能标记未固定细胞的内质网。

附加材料（同见基本方案 1；带√项见附录 1）

√0.5 μg/ml $DiOC_6$(3)工作液溶于合适的细胞生长培养基中

氧化酶（Oxyrase，Inc；任选）

1. 用最少量的硅树脂高度真空油脂涂于硅胶盒的两个面（短时间观察时，不要消毒），再将涂抹后的硅胶盒压在载玻片上。
2. 用钟表镊子夹起一长有细胞的盖玻片。盒内装满 0.5 μg/ml $DiOC_6$(3)工作液（仅染线粒体时，用 0.1μg/ml），再将盖玻片细胞面朝下置于硅胶盒上。轻轻向下按压盖玻片，使盖玻片黏在盒上达到封闭的效果（图 5.4.1）。用拭镜纸吸干多余的液体。如果盒内有大气泡的话，则重新封闭。
3. 用装有荧光素滤片及 63×或 100×油浸物镜的荧光显微镜观察细胞（单元 5.2）。如果 10min 后只有线粒体着色的话，则改用 1μg/ml $DiOC_6$(3)染液。如果看到细胞不正常或从盖玻片上浮起的话，则要降低染液浓度。如果光力学型损害或光漂白妨碍实验的话，则用含 0.3U/ml 氧化酶的培养基清除氧气。

基本方案 2　活细胞内高尔基复合体染色

用 C_6-NBD-Cer 或 BODIPY-Cer 进行染色时，内质网、核膜及线粒体最先出现荧光，不过一段时间后，由于荧光脂类优先插入高尔基复合体膜内，高尔基复合体开始出现荧光。可以固定和进一步处理标记细胞，进行双色荧光标记（单元 5.3），用来比较

高尔基复合体与细胞内其他标记物的分布。

材料（带√项参见附录1）

感兴趣的细胞

√ 0.05%胰蛋白酶溶于不含钙和镁的HBSS

√ 1mg/ml D-多聚赖氨酸或L-多聚赖氨酸

√ 1mmol/L神经酰胺荧光衍生物工作液溶于乙醇

合适的无血清细胞培养基

√磷酸盐缓冲液（PBS），4℃

10%（w/v）脱脂BSA（Sigma）溶于合适的无血清细胞培养基

√ Fluoromount G（Southern相关生物技术或电子显微镜术科学）或封片剂

合适的HEPES缓冲细胞培养基，pH7.0，含10%血清，不含酚红

Watchmaker's镊子

直径为12mm的1号盖玻片（用95%乙醇火焰消毒）

10 cm无菌细胞培养皿

Hamilton注射器

传统的荧光显微镜，装有荧光素和罗丹明滤片

√硅胶盒

63×（1.4 NA）或100×（1.3 NA）的油浸物镜

显微镜气流恒温箱（microscope air-stream incubator，Nevtek）

1. 用（Watchmaker's）镊子将1号12mm的圆形盖玻片置于10cm的无菌培养皿内（它最多可容纳8个盖玻片）。
2. 实验前1～2天，用0.05%胰蛋白酶处理细胞（单元1.1），并将其种到含盖玻片的培养皿中（汇合度约50%时最适于观察）。如果细胞长势不好，则需要在种细胞前，先用1mg/ml D-多聚赖氨酸或L-多聚赖氨酸处理盖玻片15min。
3. 用Hamilton注射器取少量1mmol/L溶于乙醇的神经酰胺衍生物工作液，室温下涡旋振荡，将其注入无血清培养基（神经酰胺衍生物及乙醇的终浓度分别为5～10mmol/L及<5%）。
4. 将盖玻片放入装有冰PBS的培养皿中，2min。更换新的冰PBS，再重复一次。
5. 给细胞加足量的含神经酰胺衍生物的培养基，完全覆盖培养皿底部及盖玻片表面。4℃孵育30min。

   对于每种细胞类型及所要求的亮度水平，均应优化标记物的量（步骤5）及染色时间（步骤5和7）。注意重复成像会加速荧光脂类的光漂白。

6. 用冰PBS洗细胞3次以去除未结合的脂类。4℃，用10%脱脂BSA的培养基孵育30min。
7. 给细胞加温至37℃，并保持37℃，在荧光显微镜下观察，以确定高尔基复合体标记最好而其他细胞内膜标记最少的时间（一般为15～40min后）。
8. 在盖玻片的细胞面加一滴Fluoromount G或封片剂。将盖玻片置于底部附有盖玻片

的硅胶盒上（参见基本方案 1，步骤 3），盒内装满 HEPES 缓冲细胞培养基，pH7.0，含 10%血清，不含酚红。

另外，细胞也可生长在公司提供的底部装有盖玻片的开放型培养皿中（Lab-Tek chamber coverglass system；Nunc）。使用这些培养皿，在细胞成像时加药或加其他试剂非常方便，不过这些盒只能用于倒置显微镜。

9. 在盖玻片不含细胞的一面加一滴浸油。在荧光显微镜下，用 63× 或 100× 的油浸物镜及荧光滤片（如激发波长 450～490nm，发射波长 520～560nm）观察 C_6-NBD-Cer 标记的细胞，或者选荧光素滤片或用激发波长为 450～490nm 且收集波长大于 590nm 的滤片组合来观察 BODIPY-Cer 标记的细胞（单元 5.2）。观察时用显微镜气流恒温箱使细胞保持 37℃。

   共聚焦显微镜成像时，用激发波长为 488nm 的氪/氩激光器。

   由于通常只在高尔基复合体内形成 BODIPY-Cer 激发物，所以显示红移的 BODIPY-Cer 信号而不显示绿色 BODIPY-Cer 信号就很容易避免来自含 BODIPY-Cer 的非高尔基膜（包括内质网和细胞膜）的绿色信号干扰。

基本方案 3　线粒体染色

这种简单的染色方法只适于活细胞，而不适于固定细胞的线粒体染色。温度调节对哺乳动物细胞生理状态下的实验是非常必要的；对不同溶液及介质的通透性也很重要。

材料（带√项见附录 1）

细胞
√标准缓冲液（NB）
√ 100nmol/L TMRE 工作液溶于标准缓冲液
直径为 31mm 的 1 号盖玻片（Bioptechs）
60mm 培养皿
镊子
棉签或拭镜纸
温控显微镜盒拭镜纸
装有罗丹明滤片的传统荧光显微镜或共聚焦显微镜（单元 5.2）
40×或倍数更高的油浸物镜

1. 采用适当的方法在直径为 31mm 的 1 号盖玻片上培养细胞。
2. 在 3 个培养皿中装满 NB，在另一个组织培养皿内装满 100nmol/L 溶于 NB 的 TMRE 工作液。用镊子夹住盖玻片轻轻浸入 3 个装满 NB 的培养皿，最后再浸入装满 TMRE 的培养皿内。然后再放入装满 100nmol/L 溶于 NB 的 TMRE 工作液的一个新培养皿内，孵育 10min。
3. 从培养皿中取出盖玻片，用棉签或拭镜纸将盖玻片底部擦干。放于显微镜盒内，并在盒内装满 100nmol/L 溶于 NB 的 TMRE。
4. 用装有罗丹明滤片的传统荧光显微镜观察细胞，或用装有激光器的共聚焦显微镜观察

标本，激光器的激发波长为540nm或568nm。观察时选用40×或倍数更高的油浸物镜。

这种染色足以用来观察线粒体的分布、流动性或线粒体膜电位的相应水平。需用弱光成像和图像数字化技术来定量检测膜电位。Loew等（1993）和Loew（1998）详细阐述了这方面的内容。

参考文献：Chen，1989；Haugland，1996；Lipski and Pagao，1985；Loew et al.，1993；Loew，1998；Presley et al.，1997；Terasaki，1993

撰稿人：Mark Terasaki，Leslie Loew，Jennifer Lippincott-Schwartz 和 Kristien Zaal

（冯　若　张钦宪 译）

单元5.5　基本共聚焦显微镜术

共聚焦显微镜可清晰地显示相对较厚的（厚达几百微米）标本内部结构图像，尤其适于检测荧光标本。使用传统的宽视场荧光显微镜时，由于标本全层的荧光团都被光照到，而且它不仅收集焦平面上的荧光信号，还收集焦平面上下方的荧光信号，所以用它来观察较厚荧光标本时，图像模糊且反差小。而共聚焦显微镜则选择性收集来自标本内部相当于单一焦平面的光切面（约1μm）的光线。由于共聚焦显微镜基本没有来自离焦区的光线，所以它所观察的焦平面内结构要比传统显微镜清晰得多。一系列不同厚度的光切面可使标本的三维图像得以重建。

在检测组织片或完整的小生物（如果蝇和斑马鱼的胚胎）中的荧光染色细胞时，可选用共聚焦显微镜。共聚焦显微镜也可用来定位分离细胞内的荧光标记分子。由于其灵敏度较高，甚至可以用来监控活体标本内的荧光，使得示踪荧光探针如绿色荧光蛋白的利用成为可能。此外，有些型号的共聚焦显微镜加以调整后，可用于光漂白实验及光敏化“笼锁”分子（紫外光照射前为失活状态）。

光切基础

共聚焦显微镜通过聚焦光束扫描标本及荧光信号的收集来实现光切，所收集的荧光信号为通过空间滤波器（常为针孔式）的所有光点，而空间滤波器是用来阻挡来自标本离焦区域的信号的。图5.5.1描述了荧光共聚焦显微镜进行光切的结构基础。光源（常为激光器）均匀地照亮物镜后焦平面，并将光线聚焦在标本内的衍射极点上。尽管焦平面上下方也能被照到，不过焦点照射强度最大。由入射光激发的荧光分子向各个方向发出荧光。物镜收集的荧光聚焦在像平面上，它与标本内的焦平面是共轭的（共焦的）。像平面内的针孔孔径允许标本内照明点发出的荧光通过并到达检测仪，但却阻止来自离焦区域的光线通过。

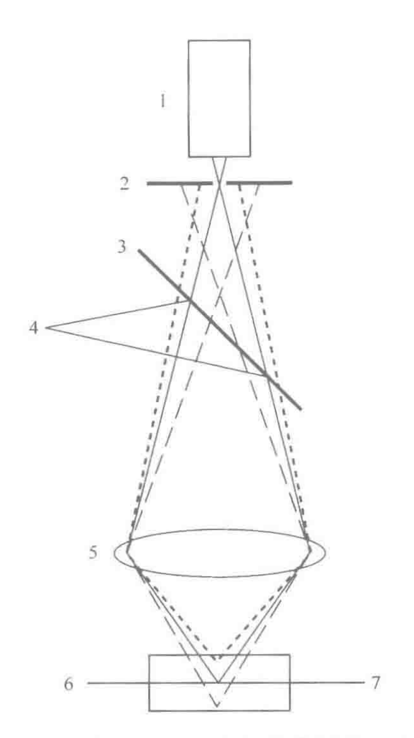


图 5.5.1 共聚焦表面荧光显微镜术的光切基础

分色镜反射点光源照明光，物镜将光线聚焦在标本内的衍射极点上。激发焦点及其上下光锥内的荧光团，发出比入射光波长更长的荧光。由于荧光波长更长，所以可通过分色镜。共聚焦针孔孔径允许来自标本内焦平面的荧光通过并到达光电检测仪，但却阻止来自离焦区域的光线通过。该图改自 Shotton (1993)。

1. 光检测仪 2. 共聚焦针孔 3. 分色镜 4. 点光源 5. 物镜镜头 6. 焦平面 7. 标本

针孔直径决定了检测标本内照明点发出荧光量的多少以及光切面的厚薄。由波动光学理论可知，物镜焦平面内的点光源可在像平面内产生一个三维衍射图。像平面的横切面为艾里斑（Airy disk，即中间为一亮区的环形衍射图）。标本读数系统内的艾里斑中央亮区直径由 $R_{Airy}=0.61\lambda/NA$ 决定，λ 为发射波长，NA 为物镜的数值孔径（参见单元 5.1 关于 NA 的内容）。在像平面上（即针孔孔径的位置），中央亮区直径为 R_{Airy} 与该平面上放大倍数的乘积。

调节针孔直径使其略小于艾里斑的中央亮区直径，这样来自焦点的大部分光线可到达检测仪，同时可将离焦区域产生的背景降至相当于宽视场显微镜的 1000 倍。采用共聚焦显微镜术检测厚标本的主要优势，在于适当调整针孔可分离聚焦信号与离焦背景。

相对于传统显微镜来说，检测光路中的点照明器与针孔可提高横向及纵向分辨率（表 5.5.1）。而实际提高幅度取决于针孔大小。针孔直径约为 $0.7\times R_{Airy}$ 时，纵向分辨率接近最大值；针孔直径小于 $0.3\times R_{Airy}$ 时，横向分辨率达到最佳。然而针孔直径小于 $0.7\times R_{Airy}$ 时，总的信号强度会大大降低，或许此时较高的分辨率并不足以弥补这种损失；信号较弱的标本成像时，更是如此。荧光成像时，分辨率还会受到发射波长及激发波长的影响。

共聚焦显微镜的类型

共聚焦显微镜有几种，每一种都有其独特之处及优势所在。荧光标本检测最常用激光扫描共聚焦显微镜。正如其命名，这些荧光显微镜的光源是激光器，通过扫描穿过标本的激光束而成像。

激光器在较窄的波长范围内产生强光。表 5.5.2 列出了几种激光器的发射波长及常见荧光团的激发光谱。由于氪-氩气体激光器发射三种彼此分离的波长（488nm、568nm、647nm），可同时显示 2 或 3 种荧光团（如 FITC、丽丝胺罗丹明和 Cy5），所以它被普遍用于多波长共聚焦显微镜。氪-氩气体激光器的缺点在于它的寿命很短（约

2000h)。获取多波长激发光的另一方法是联合应用两种或两种以上的激光器（图5.5.3）。

表 5.5.1　共聚焦及传统显微镜分辨率的理论值[a]

$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$	物镜					
	10×，0.4NA，干式		40×，0.85NA，干式		60×，1.4NA，油浸式	
	Lat. Res.	Ax. Res.	Lat. Res.	Ax. Res.	Lat. Res.	Ax. Res.
共聚焦荧光显微镜						
488/518	0.55	4.50	0.26	0.99	0.16	0.56
568/590	0.64	5.17	0.30	1.09	0.18	0.64
647/677	0.72	5.88	0.34	1.28	0.21	0.72
传统荧光显微镜						
518	0.79	6.48	0.37	1.43	0.24	0.93
590	0.90	7.38	0.42	1.63	0.28	1.06
680	1.04	8.50	0.49	1.88	0.32	1.22

a. 代表数据摘自 Brelje 等（1993），并经 Academic Press 允许；λ_{ex}与λ_{em}分别代表激发波长与发射波长；Lat. Res. 与 Ax. Res. 分别代表横向分辨率与纵向分辨率。

现有几种用激光束照亮标本内不同位置进行标本扫描的方法。最常用的方法是用一对检流计反射镜扫描通过标本的激光束，同时收集标本发出的荧光（图 5.2.2）。其中一个检流计反射镜扫描 x 轴上连续的点，另一个检流计反射镜则沿 y 轴逐线移动。双色分束镜将荧光与照明光分离，荧光射向光电倍增管，它可收集照亮标本内各点时产生的荧光。电检测仪结果转化为数字化图像，后者可在监视器上显示，也可以数字化图像格式保存，将来可以进行图像分析。它可编码 256 灰度，尽管最近有 12 位或 16 位数字转换器，但大多数激光扫描共聚焦显微镜仍采用 8 位数字转换器。整个图像（一般为1024×1024 像素）收集大约需要 2s。使用检流计反射镜扫描仪的激光扫描显微镜获取图像的速度相对较慢，所以有时又称它为慢扫描显微镜。有一些厂家供应慢扫描显微镜(Bio-Rad，Zeiss，Leica，Olympus，Nikon，Molecular Dynamics，以及 Meridian；参见附录 A4 和 http://www.mwrn)。

激光扫描显微镜内检流计反射镜的移动由计算机控制，使其扫描方式有一定的灵活性。例如，通过缩小扫描面积及缩短样本点之间的距离对感兴趣的部分进行放大。此外，许多激光扫描共聚焦显微镜还能对单一条线进行反复扫描，或者使扫描仪停止移动直至只在监视器上的一个点显示荧光。后者在研究迅速变化的荧光信号时尤其有用，如活跃的神经元内的 Ca^{2+} 指示剂产生的信号。

激光扫描显微镜可以摄像速度（30 帧/s）或更高速度来收集图像。像声光偏转器、旋转镜或共振镜几种方法可用于获取快速扫描（Noran，Life Sciences Resources 及 Meridian；参见附录 4 和 http://www.mwn)。然而成像速度的提高也要付出一定的代价。

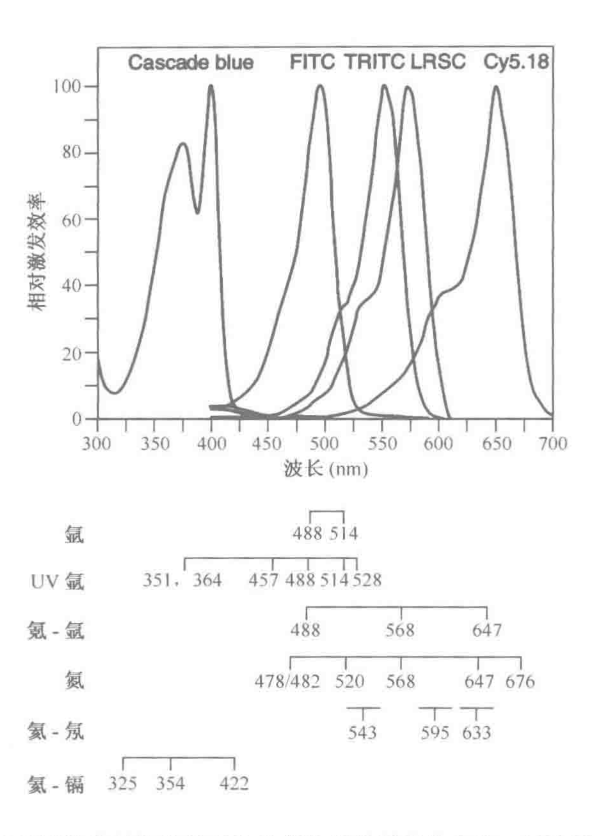


图 5.5.2 各种激光器的发射波长及代表性荧光团发射光谱比较。最常用于激光扫描共聚焦显微镜的激光器为气冷式氩、氪-氩及氦-氖激光器。UV 氩激光器为水冷式，价格也很高。可将其设定为只产生 UV 波长（351nm 和 364nm）的光或者 UV 及更长波长的光。喀斯特蓝（Cascade blue）、荧光素（FITC）、四甲基罗丹明（TRITC）、丽丝胺罗丹明（LRSC）和花青（Cy5.18）的激发光谱数据摘自 Wessendorf 和 Brelje（1993），可从 Aryeh Weiss 网页上下载，http://optics.jct.ac.il/～aryeh/Spectra。经 Brelje et al. 修正改良（1993）

例如，快扫描共聚焦显微镜可控程度不如线顶式（top of the line）慢扫描显微镜扫描模式，有些以摄像速度成像的共聚焦显微镜不能选用多波长照明。以摄像速度成像的显微镜要选用裂隙孔径而不是针孔孔径，而前者的横向及纵向分辨率较差。

有一种快速扫描共聚焦显微镜，因为它价格低廉（还有其他原因）值得一提，它用有多个针孔（约 200 000 个）的自旋盘同时照明来检测标本内多点的发射光。光源可以用激光器或那种用于传统表面荧光显微镜的宽光谱灯。这种共聚焦显微镜的主要优点在于它能较快的采集图像［高达 700 帧/s，解线率（lines resolution）为 5000 线］。它的图像可以直接用眼观察，也可以用灵敏的相机照下来。它的主要缺点在于自旋盘只能通过获得光线的 1%左右，原因在于自旋盘内的孔需要较大的间隔。最近有一种新型自旋盘共聚焦显微镜问世了，它用显微透镜来提高透光率，共聚焦成像速度高且灵敏度也较高（Ultra View; Life Sciences Resources）。

另一种很有价值的激光扫描显微镜采用了双光子（和三光子）激发来诱导荧光产

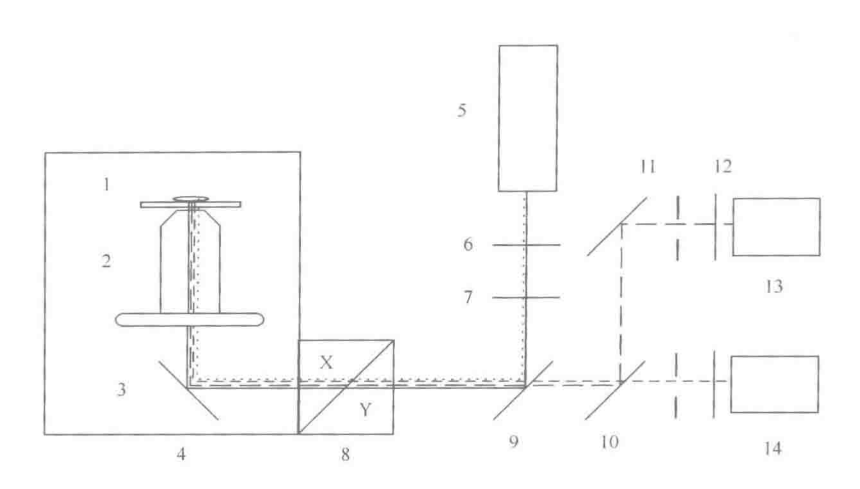


图 5.5.3　适于同时显示 FITC 及丽丝胺罗丹明的激光扫描共聚焦显微镜的光路。双色分束镜 1 将氪/氩激光器产生 488nm 和 568nm 的光反射到显微镜光轴上。扫描仪有两个检流计反射镜，它可以在 x 轴及 y 轴上移动光束。反光镜将光束反射到物镜，物镜再将光束聚焦在标本上。以光栅模式逐线扫描标本。照亮标本各点时产生的荧光沿反方向通过扫描系统。FITC 荧光（波峰为 520nm）及丽丝胺罗丹明荧光（波峰为 590nm）通过双色分束镜 1 到达双色分束镜 2，后者将丽丝胺罗丹明荧光传至光电倍增管 1，将 FITC 荧光反射至光电倍增管 2。每个光检测仪前的可变针孔可阻断标本离焦区域的光线，同时允许光点处的光线通过并到达检测仪

1. 标本　2. 物镜　3. 反光镜　4. 显微镜　5. 氪-氩激光器　6. 线性-选择滤镜　7. 中密度滤镜　8. 扫描仪　9. 双色分束镜 1　10. 双色分束镜 2　11. 可变针孔　12. 发射滤镜　13. 光电倍增管 1　14. 光电倍增管 2

——488-nm 激光束　- - - -丽丝胺罗丹明　— — —　FITC　……568-nm 激光束

生。荧光团吸收两个光子时产生双光子激发，每个光子各自拥有促使荧光团进入激发态的能量的一半。只有在焦点位置的光强度才能满足同时吸收双光子的需求，所以只有焦平面上的荧光团才能被激发。因此，在检测仪前不安装空间滤光片的情况下，双光子激发仍可以进行光切。此外，由于焦点外的荧光团不被激发，所以与传统的激光扫描显微镜相比，它的标本不容易发生光漂白。与单光子激发相比，双光子吸收用以激发可见光荧光团所需的波长更长、组织穿透力更好，因此能检测标本更深处的结构。另外，传统激光扫描显微镜选用紫外波长时，紫外荧光团成像会出现较多问题，但如果使用双光子激光扫描显微镜，则许多问题都不会发生。目前双光子共聚焦显微镜的一个缺点是合适的激光器的价格太高（约 1000 美元）。现在市场上已有双光子扫描显微镜（Bio-Rad，Leica）。

应用指南

成像参数的优化

物镜选择

由于大数值孔径的物镜比小数值孔径的物镜采光多（亮度相当于 NA^4），所以通常荧光显微镜最好选用大数值孔径的物镜。大多数高质量大数值孔径的物镜的可见光波长

透射率大于 80%，不过有些物镜的紫外区波长透射率较低。

观察水溶液中的标本（如活标本）时最好选用浸水式物镜。最近几家显微镜厂商专门为使用共聚焦显微镜观察生理状态下的标本而设计了大数值孔径的浸水式物镜。该物镜与之前所用的浸水式物镜不同，它可供观察固定在盖玻片下方的标本，工作距离约为 250μm。

油浸物镜的数值孔径可比浸水式物镜的数值孔径大。尽管目前有些油浸物镜的工作距离约为 200μm，但大多数油浸物镜的工作距离都相当短（约为 100μm）。只有用与浸油折光率（η=1.518；参见表 5.5.2）匹配的介质固定标本时，才能选用长工作距离的油镜。如果选用含水的固定介质，则标本内厚度超过 20μm 左右处的图像效果将明显下降，图像效果下降是由球面像差造成的。此外，z 轴上的距离检测也需要校准。物镜移动（d_{obj}）所引起的标本内焦平面移动幅度（d_s）取决于标本折光率与浸入介质折光率的比值。$d_s/d_{obj}=\eta_s/\eta_{obj}$ 可较合理说明它们之间的大概关系。

针孔大小

如上所述（参见光切基础），针孔大小是影响成像质量的重要因素。与第一个最小艾里斑半径（近似于达到最大强度一半时的半径）相同的针孔，允许来自焦平面的大部分光线到达检测仪，同时阻止来自离焦区域的大部分光线通过。尽管它的横向分辨率不如选用更小的针孔，但却比选用同样光学系统的传统显微镜要高 20%。在针孔半径逐渐减小至约 0.2×艾里斑半径的过程中，横向分辨率随之逐渐提高，但是如此小的针孔将导致 95%的信号不能通过。在针孔半径逐渐减小至约 0.7×艾里斑半径的过程中，纵向分辨率也随针孔半径的减小而逐渐提高，继尔保持稳定。信号强度与分辨率之间的最佳平衡点取决于标本特性及实验目的。

表 5.5.2　常用浸入介质及固定介质的折光率

介质	折光率
浸入介质	
空气	1.00
水	1.338
甘油	1.47
浸油	1.518
固定介质	
50%甘油/PBS/DABCO	1.416[a]
5%没食子酸丙酯/0.0025%溶于甘油的对苯二胺（PPD）	1.474[a]
0.25% PPD/0.0025% DABCO/5%溶于甘油的没食子酸丙酯	1.473[a]
封片剂（Vector Labs）	1.458[a]
Slow Fade（Molecular Probes）	1.415[b]
Prolong（Molecular Probes）	1.3865[b,c]

a. 数据摘自 Bacallao et al.（1995）。

b. 数据摘自 Molecular Probes。

c. 液体介质的折光率（固体介质的折光率更高）。

缩放因子

共聚焦显微镜的缩放设置决定扫描范围与图像的直观放大倍数。缩放因子 2 的扫描面积的长宽均为缩放因子 1 的一半。图像由相同的样本数（水平轴上的点数，垂直轴上的线数）构成并以固定数值的像素呈现在图像监视器上，像素值与缩放因子无关。因此，缩放因子 2 产生图像的像素代表标本内某面积，该面积各方向上的大小均为缩放因子 1 所产生图像面积相应方向上值的一半。如果缩放 1 的物镜像素值为 $0.25\mu m \times 0.25\mu m$，那么缩放 2 的物镜像素值为 $0.125\mu m \times 0.125\mu m$。像素大小与缩放设置呈负相关。

每种物镜都有其最佳的缩放设置，它产生的像素小得足以利用物镜的全分辨率，同时也要足够大以避免取样过多。为了能在监视器上看见最小可辨实体，像素值要小于（小于一半）光学分辨率。但是，如果用更高而不是最佳的缩放因子使像素变得太小的话，标本将受到更多不必要的辐射，导致光漂白的危险性增加。光漂白率的增加幅度与缩放因子的平方成正比。信息理论（奈奎斯抽样定理，Nyquist sampling theorem）的合适缩放因子的选择指南中讲到，像素值等于光学分辨率除以 2.3。但是，小于该值的像素显示图像的信息量更大。

z 轴的光切间距

为了研究标本的三维结构，要收集一系列不同焦平面水平的图像，相邻焦平面的间距由向聚焦器发出的指令决定。确保重建图像在 x、y 及 z 轴上的比例正确的最简单办法就是收集的光切面在 z 轴上的间距与 x、y 轴上的像素值相同。但是，z 轴上标本进行适当取样所需的焦平面间距应不小于 x、y 轴上的像素值，原因在于纵向分辨率比横向分辨率差（见表 5.5.1）。最佳的焦平面间距（依据奈奎斯抽样定理）为纵向分辨率除以 2.3。更小的焦平面间距会导致取样过多，光漂白的危险性随之增加。

照明强度

照明强度逐渐提高到使荧光发射量达到饱和水平的过程中，荧光发射量呈线性增长。照明强度刚好低于能使荧光发射量达到饱和水平时，信号背景比与信噪比达到最佳。通过在光路中插入中密度滤光片和/或使激光器在极限功率下工作来调节激光扫描显微镜的照明强度。一般来说，光漂白比例在可接受范围内的情况下，照明强度越高，得到的图像越好。

PMT 黑色电平及增益

共聚焦图像的反差及信息量受光电倍增管（PMT）放大仪黑色电平及增益的影响。为获取最大信息量，要调整黑色电平及增益至使用 PMT 的满动态量程。阻断到达 PMT 的光路的情况下，通过扫描找到合适的黑色电平。此时，显示屏上的图像亮度应略低于背景，为黑色（灰度=0）。增益的设置是通过扫描标本并调节增益，直至图像最亮像素略低于白色（灰度=255）。选择能确保所有信号均位于 PMT 动态量程内的黑色电平及增益对定量图像实验很重要。许多共聚焦显微镜的软件都包括伪彩色图像显示模

式，该模式通过用接近绝对黑和绝对白强度值增亮像素来帮助选择合适的黑色电平及增益。

平均化

由于从弱荧光标本各光点收集到的电子较少，故以标准速度（慢扫描共聚焦显微镜为 1～2 帧/s）捕获弱荧光标本而获得的共聚焦图像很杂。有时减慢扫描标本的速度可以提高信噪比。获得较好图像的另一方法就是综合从复合扫描仪捕获的信号并使之平均化（信息图像平均化）。有些共聚焦显微镜还有另一种平均化的方法（线性平均法），即重复扫描各线并加以平均。通常采用线性平均方法时，标本内移动及变化引起图像模糊的概率较小，所以线性平均法比信息图像平均法（平均化整个图像）产生的图像更清晰。

图像显示

共聚焦显微镜商品组合还提供几种图像增强及图像显示的软件。三维图像显示模式常包括 z 轴的投影，它是由许多光切面重叠而成的二维图像显示；三维图像显示还包括立体观，它是两套图像的综合：一套为 z 轴上的图像，另一套为连续图像间的转换。许多系统还能从许多角度计算标本的横切面及标本的投影。按顺序从一系列视觉角度计算得到的投影可以像电影一样呈现出来，此标本能以绕轴旋转的方式来显示。这样的电影让观察者对标本的三维几何结构留下非常深刻的印象。在许多专门为三维图像观察和分析而设计的软件包及硬件组合中还有许多其他的图像显示模式。

互联网资源

一种用于 W. Rasband 发明的 Macintosh 计算机的较好的图像分析程序，即 NIH 图像分析程序（Research Service Branch，National Institute of Mental Health，NIH）有许多可供分析共聚焦图像的有用工具。它可从 http://rsb. info. nih. gov/nih-image 下载，或通过 http//zippy. nimh. nih. gov 的 FTP 下载；还有可在 Windows 下操作的 NIH 改进版本。从分子探针网站 http://www. probes. com。可找到许多荧光探针方面的信息。

在探讨共聚焦的电子邮件清单管理的网站上（confocal e-mail listserver network），有许多共聚焦显微镜专家感兴趣的话题。要订阅该清单的话，请发送信息“subscribe confocal＜your name＞”至 listserv@ubvm. cc. buffalo. edu。

参考文献：Inoué and Spring，1997；Matsumoto，1993；Pawley，1995；Russ，1995；Shotton，1993；Wilson，1990，1995

撰稿人：Carolyn L Smith

（冯　若　张钦宪 译）

单元 5.6　用免疫过氧化物酶方法定位培养细胞和组织的抗原

在 EM 水平上运用免疫过氧化物酶标记与其他方法相比较有其自身的优点：①敏感性高；②通过 PLP 的固定将细胞器及其结构在形态保存上可达到传统的戊二醛固定样本的要求；③方法简单，除了那些需要特殊包埋的样本外，不要求特别的技术与仪器。然而，免疫过氧化物酶标记与免疫金标记方法相比有三个重要的缺陷：①免疫过氧化物酶标记从本身来说不能定量；②免疫过氧化物酶不能避免潜在的 DAB 反应产物的扩散而远离抗原抗体反应部位；③一般来说，靠过氧化物酶进行免疫双标记是不可能的。尽管过氧化物酶有其缺陷，但此方法对细胞膜连接细胞器的分子定位非常有用。

表 5.6.1　过氧化物酶标记存在的问题及解决方法

问题	可能的原因	解决的方法
轮廓不清	固定时间不够	长时间固定
	固定方法不正确	严格遵照配方，确保多聚甲醛溶解
细胞器暴露，细胞膜上有孔	DAB 反应时间过长或过快	缩短反应时间和或在冰上反应
DAB 反应产物少或没有	抗体浓度和/或亲和性低	准备 IgG 片段或亲和性高的抗体
	细胞渗透性低	增加皂角苷浓度或增加孵育时间
	HRP 偶联抗体无活性	通过小量 DAB 和双氧水检测 HRP 的活性
	双氧水质量不好	使用新鲜的双氧水，在有 DAB 的溶液和 1～2ul 的 HRP 偶联抗体的检测管中检查双氧水确保作用物变棕色或者黑色
DAB 反应产物远离反应部位和/或已经暴露出膜细胞器(见上述)	样本 DAB 沉积物反应过度 皂角苷未完全洗脱	缩短反应时间；降低一抗或者二抗的浓度增加 PBS 清洗次数
免疫荧光显示抗原是一个膜蛋白，但免疫过氧化物酶使细胞器附近而非膜内出现弥散的显色	DAB 可能在通过膜时丢失或变差，抗原决定簇识别的是膜胞浆面	若抗原决定簇是细胞浆源性则无办法，建议缩短反应时间或在冰上
DAB 反应产物能通过 LM 而非 EM 观测	OsO_4 没有适当减少	遵照配方缩小锇量
背景着色	使用非特异性抗血清或抗体	准备 IgG 片段或亲和性高的抗体，稀释抗体降低非特异性结合时尽量增加卵白蛋白浓度到 1%
DAB 不溶解	使用 3，3′-DAB 自由基	使用 3，3′-DAB 四氯化物
细胞未脱落	质量低劣的丙烯氧化物	使用 EM-级丙烯氧化物

警告：当拿 OsO_4 时戴手套，在操作包括 OsO_4 时避免锇的挥发，减少锇的浪费，根据危险化学药品的使用处理使用过的锇。

注意：必须首先审核所有用到活动物的步骤，并且报给国家动物保护使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee，IACUC) 批准或者必须遵从政府制定

的有关实验室动物保护和使用的条例。

计划策略

大力推荐做预实验，优化染色参数，这些参数都是在光镜（LM）水平用到的。开始用免疫荧光染色（单元5.3），然后用LM水平的免疫过氧化物酶标记。实践证明能产生强免疫荧光信号的实验条件（这些参数的大小）可直接用于免疫过氧化物酶标记方案。一旦摸索出了这些参数，应该在LM水平做免疫过氧化物酶标记实验的预实验，来优化HRP偶联的二抗的浓度和DAB反应的时间。

基本方案1　培养细胞的免疫过氧化物酶染色

以下大部分步骤都可被修改以满足具体的实验要求（如培养皿的大小和孵育的时间），除了另外注明，所有步骤均在室温下进行。

注意： 丙烯氧化物包埋的分离方法有一定技巧，建议在进行免疫过氧化物酶染色前进行练习。

材料（带√项见附录1）

目的细胞
√PLP固定液，新鲜配置
√PBS pH7.4
0.005%～0.05%的皂角苷/ PBS（确定免疫荧光的最适浓度，参考有关内容）
一抗（确定免疫荧光的最适浓度，参考有关内容）皂角苷/PBS含0.1%的卵白蛋白
HRP偶联的二抗；辣根过氧化物酶偶联的抗兔或抗鼠IgG的Fab片段（Biosys），溶于皂角苷/PBS含0.1%的卵白蛋白
戊二醛固定液：1.5%的戊二醛溶于5%的蔗糖/100mmol/L甲次砷酸钠，pH7.4
7.5%的蔗糖/100mmol/L甲次砷酸钠，pH7.4
√0.2%的DAB溶液，新鲜配制
3%的过氧化氢，新鲜配制
√1%OsO_4还原溶液，新鲜配制，冰预冷
100mmol/L甲次砷酸钠，pH7.4，冰预冷
70%、95%、100%的乙醇
100%的丙烯氧化物，EM级
1∶1的丙烯氧化物/塑料包埋树脂（如Spurr's）
100%的塑料包埋树脂（如Spurr's）
35mm的处理过的培养皿
水平振荡器
湿盒

1. 在 35mm 的培养皿中培养细胞至 75%汇合度，准备 2 或 3 个培养皿。

   这个方案专为已建系的单层贴壁细胞而设；然而，悬浮培养的细胞很多情况下能黏附到涂有多聚赖氨酸的培养皿上并且可按本单元所讲述的步骤进行处理。这个方案也能用于原代细胞培养。

2. 用 1ml 的 PLP 固定液取代培养基固定细胞，防止细胞变干，在水平振荡器上孵育 2～3h，去除固定液，用 1～2ml 的 PBS，pH7.4 冲洗细胞 3 次，每次 5min。
3. 去除 PBS，加 1～2ml 的 0.005%～0.05%皂角苷/PBS，轻微晃动，孵育 5min。
4. 去除皂角苷/PBS，加入≥0.5ml 的一抗（皂角苷/PBS)。轻轻晃动孵育 1h 以上，或在室温下孵育 30min，盖上湿盒，4℃过夜。
5. 用 1～2ml 的皂角苷/PBS 冲洗细胞 3 次，每次 5min，去除冲洗液，加入 0.5～0.7ml 的 HRP-偶联的二抗，通过预实验确定稀释二抗浓度（如 1∶400 到 1∶800)，轻轻晃动孵育 1h 以上。
6. 用 1～2ml 的皂角苷/PBS 冲洗细胞 3 次，每次 5min，用 1～2ml PBS 冲洗 3 次，每次 5～10min 以漂洗皂角苷。
7. 去除 PBS，加入 1ml 的戊二醛固定液，轻轻振动孵育 30～60min 以固定细胞。
8. 用 1～2ml 的 7.5%的蔗糖/100mmol/L 甲次砷酸钠，pH7.4，冲洗 3 次，每次 5min。
9. 去除冲洗液，加入 1ml 0.2%的 DAB 溶液。

   注意： DAB 是一种致癌剂，在操作时要戴上手套，保持空气流通. 用漂洗液处理所有含 DAB 的溶液和容器，并根据国家对有害化学物质的规定进行处理。

10. 加入 3.3μl 3%的双氧水开始 DAB 反应，快速充分混合 DAB 和双氧水，开始计时，使用光镜监测反应，分别观察，使一个皿反应清晰，一个皿反应至可见棕黑色的 DAB 的反应产物，一个皿介于两者之间（最佳时间 2～30min)。
11. 去除 DAB 终止反应，快速用 1～2ml 的 7.5%的蔗糖/100mmol/L 甲次砷酸钠，pH7.4，冲洗 3 次。
12. 去除洗涤液，用 1ml 冰预冷 1% OsO_4 溶液在通风环境中降解细胞，覆盖培养皿，放置湿盒中. 密封，若密封不严，则使用封口膜，在 4℃孵育 1h，轻轻摇动。
13. 重新置细胞于通风环境，去除锇溶液，快速用 1～2ml 冰预冷的 100mmol/L 甲次砷酸钠，pH7.4 洗 3 次，允许细胞达到室温。
14. 与常规的石蜡包埋步骤一样，细胞经过浓度梯度（70%、95%、100%）乙醇脱水，每种浓度的乙醇溶液用 2ml，快速脱水 3 或 4 次。
15. 去除乙醇，用玻璃巴斯德移液管快速加入 0.5～1ml 的 100%的丙烯氧化物。

    注意： 通风环境下包埋。

16. 用移液管的头部在培养板底部像棋盘样划线. 立刻用吸管上下反复吸丙烯氧化物以使细胞从培养皿中分离（培养板底开始变花，然后变白，能看到细胞成片地脱落)。
17. 如果只需得到一种细胞沉淀物（如来源相同而反应时间不同的所有细胞)，就将培养皿中经过不同的 DAB 孵育时间获得的群落细胞收集在一起。而为了确定哪种 DAB 反应时间提供最佳的 EM 水平染色，就必须把每个培养皿中的细胞放置在不同的微量离心管中。

18. 离心获得致密的细胞沉淀，用水平转子（如 11 号 Beckman 显微离心管）最高转速旋转 2～3min。

注意：确保盖紧盖子，因为丙烯氧化物气体具有爆炸性。

19. 去除丙烯氧化物，用 1ml 100％丙烯氧化物洗涤细胞沉淀 2 次，如果细胞沉淀分散，再次离心。
20. 去除丙烯氧化物，加入 1ml 1∶1 的丙烯氧化物/塑料包埋树脂孵育 30min，温和翻转。
21. 去除 1∶1 的混合物，用 1ml 100％的塑料包埋树脂冲洗细胞沉淀 2 次，用 100％的塑料包埋树脂孵育过夜，轻轻晃动。
22. 根据厂商说明，更换新鲜的树脂混合物，使细胞沉淀聚合。
23. 用超薄切片方法切开银/金接触的部分。
24. 用柠檬酸铅染色较薄的切片，弃去双氧铀乙酸盐，产生一个良好的信（DAB-OsO_4 沉淀）噪（剩余的胞质）比。详细步骤见 Brown 等（1984）。
25. 通过标准 TEM 观察组织切片，如果有必要，通过在低电压下操作 EM 可增加（稍微）致密电子产物的对比度（如 60 比 80kV）。

基本方案 2　组织的免疫过氧化物酶染色

在组织细胞内定位抗原可以提供一类有价值的数据，这类数据可以作为用过氧化物酶标记技术在培养的细胞中获得的即定数据的补充（见基本方案 1）。因为运用这种方法通常能检测出大量不同类型的细胞，所以该方法要求实验人员能熟练操作低温组织切片机。

材料（带√项见附录 1）

动物组织
√PLP 固定液，新鲜配置
√PBS pH7.4
用 PBS 配制 10％的 DMSO，4℃
异戊烷
液氮
组织-Tek OCT 复合物
用 PBS 配制 0.1％的卵白蛋白
一抗（用含 0.1％的卵白蛋白和 0.02％的 NaN_3 的 PBS 配制）
连接有 HRP 的二抗：用 0.1％的卵白蛋白/PBS 溶液配制抗兔或抗鼠 IgG（Biosys）的连有辣根过氧化物酶的 Fab 片段
戊二醛固定液：1.5％的戊二醛溶于 5％的蔗糖/100mmol/L 甲次砷酸钠，pH7.4
7.5％的蔗糖/100mmol/L 甲次砷酸钠，pH7.4
√0.2％的 DAB 溶液，新鲜配制
3％的过氧化氢，新鲜配制

√1% OsO_4 还原溶液，新鲜配制，冰预冷

100mmol/L 甲次砷酸钠，pH7.4，冰预冷

70%、95%、100%的乙醇

100%的丙烯氧化物，EM 级

1∶1 的丙烯氧化物/塑料包埋树脂（如 Spurr's）

100%的塑料包埋树脂（如 Spurr's）

烧杯

泡沫聚苯乙烯盒

10mm×75mm 检测管

慢移动振荡器或混合器

扁平的包埋模型

1. 用 PLP 固定液固定动物组织 5min。
2. 取材，浸入到 5ml 的 PLP 固定液中，将组织切块（约 $2mm^3$）．如果有需要，可以获得和固定动物体内各种组织以建立一个组织库，继续固定组织 4～6h。
3. 用 5ml pH7.4 的 PBS 洗组织块 4 次，每次 15min，放入冰预冷的 5ml 含 10% DMSO 的 PBS 中，置于 4℃，1h。
4. 在一个金属容器（约 50ml）中放入 3/4 的异戊烷，在泡沫聚苯乙烯盒的底部钻一个小于金属容器直径的孔，将金属容器放入孔中在泡沫聚苯乙烯盒中充入液氮并高于异戊烷的水平，等待异戊烷的冻结（10～20min）。
5. 用一个金属棒在冻结的异戊烷上溶解一个洞使之足以放下一块组织。
6. 等几秒钟，使异戊烷变冷（而未冻结），在此期间，将一块组织放到木棍的末端。
7. 快速地将带有组织块的木棍置于液态的异戊烷洞中（组织会冻结，并在几秒钟变白），5～10s（不要放时间太长，否则异戊烷会与组织冻结），移开棍放入液氮中，直到所有组织块冻结（可能偶尔需要重溶异戊烷）。
8. 用解剖刀刮掉棍上的组织块，将其放入液氮中，小心勿将手指碰到液氮。
9. 在冷冻管上打几个小孔，以便冻存过程中液氮完全浸润组织块，用一个预冷的钳子取出冻结的组织块，放入冷冻管中，无限期储存在液氮罐中（这是很好的冻存场所）。
10. 从液氮罐中取出冻存的组织，并且在切片以前，必须浸润在液氮中。
11. 取出一个组织块，放入到组织-Teck OCT 复合物中，将组织置于低温切片机上，温度为－20～－18℃。
12. 根据说明书切成 10～20μm 厚的组织片。将组织片放入 10mm×75mm 的试管中，每管 2～4 片，管中有 2～3ml 0.1%的卵白蛋白/PBS，可置于室温。

    薄切片可使抗体进入，但是过薄则难操作并容易使切片卷曲，一些组织要求一定厚度，如肾组织要求切 30μm.

13. 切片可以沉入管的底部，去除 0.1%的卵白蛋白/PBS，温和地加入 200～300μl 一抗，避免任何物理性损伤。
14. 封管，温和地摇动混合，孵育过夜，使切片浸入液体，防止干燥。

15. 用 1ml0.1%的卵白蛋白/PBS 洗组织 6 次，每次 15min，去除洗涤液，加入 200～300μl HRP-偶联的二抗，根据起初的免疫过氧化物酶染色实验确定浓度（1∶400～1∶800 是一个好的起始点），孵育 2h。
16. 用 1ml 0.1%的卵白蛋白/PBS 洗组织 4 次，每次 15min。
17. 去除 0.1%的卵白蛋白/PBS，加入 1～2ml 戊二醛固定液孵育 60min，温和摇动，用 1ml 7.5%的蔗糖/100mmol/L 甲次砷酸钠，pH7.4，洗切片 4 次，每次 10min。
18. 去掉洗涤液，加入 1ml 0.2%的 DAB 孵育 1h。

    注意：DAB 是一种致癌剂，在操作时要戴上手套，保持空气流通．用漂洗液处理所有含 DAB 的溶液和容器，并根据国家对有害化学物质的规定作处理。
19. 如果使用倒置显微镜，将切片放入盘中，加入 3.3ul 3%的双氧水开始 DAB 反应，快速充分混合 DAB 和双氧水，开始计时，监测反应。使几个组织片反应至黑色，而另外几个切片反应较短时间（最佳时间在 5～30min）。
20. 去除 DAB，终止反应，用 7.5%的蔗糖/100mmol/L 甲次砷酸钠，pH7.4，快速洗 4 次。
21. 将管置于冰上，去除洗涤液。在 200～300μl 冰预冷的 1%OsO_4 还原溶液中超声降解组织片，封管，4℃孵育 1h。
22. 将管放入湿盒，去除锇溶液，快速用 100mmol/L 甲次砷酸钠，pH7.4，洗涤切片 3 次，可置于室温。
23. 与常规的石蜡包埋步骤一样，切片经过浓度梯度（70%、95%、100%）乙醇脱水，每种浓度的乙醇溶液用 2～3ml，快速浸片 3 或 4 次。
24. 去除乙醇，用 2 倍体积的 100%的丙烯氧化物取代乙醇，用 1 倍体积的 1∶1 的丙烯氧化物/塑料包埋树脂取代丙烯氧化物，温和混匀，孵育 30min.

    注意：通风环境下包埋。
25. 去除 1∶1 的丙烯氧化物/塑料包埋树脂，加入 1 体积非聚合 100%的塑料包埋树脂，温和地混合过夜．用不到 2 体积的新鲜树脂取代。
26. 将切片放入包埋盒中，根据说明书在盒中加入树脂并聚合。
27. 切银/金切片，用柠檬酸铅染色（见基本方案 1，步骤 24～25）。

参考文献：Brown et al.，1984；Brown and Farquhar，1989；MClean and Nakane，1974；Novikoff，1980

撰稿人：William J. Brown

（刘书漫　张钦宪 译）

单元 5.7　低温免疫金电子显微镜技术

本单元主要描述运用高解析的低温免疫金电子显微镜技术定位亚细胞蛋白质/抗原，此方法可在超微水平上进行局部解剖生化的研究。

运用这种方法最常遇到的染色困难是低质量的切片，缺乏特异性标记，背景着色

深，假阳性，对比弱。差的切片通常由于标本制备不当或冰冻切片机不稳定。非特异性标记是由于在乙醛固定之后抗体不能识别抗原；特异性标记最理想的对照是在一类不表达目标抗原的细胞中过表达该抗原。假阳性常常在运用双标记时出现。在这种情况下，金颗粒的两侧粘连在一起，之间距离小于 20nm，这样常常被误认为是只定位。栅格上的污点常常由试剂的磷酸化污染引起。另外，在免疫孵育过程中切片干燥也会产生污点。

注意：固定剂对皮肤、鼻子和眼睛都有腐蚀作用，因此操作时最好戴双层手套。

基本方案　免疫金标记

材料（带√项见附录 1）

√PBS/0.15mol/L 甘氨酸
√PBS/0.1%和 1%BSA
√溶于 PBS/ 1%BSA 的一抗
√溶于 PBS/ 1%BSA 的二抗（可选择）
√溶于 PBS/ 1%BSA 的 OD 为 0.1 的 10nm 蛋白 A-金微粒
√溶于 PBS/ 1%戊二醛
√双氧根草酸盐溶液（可选择）
√甲基纤维素/双氧根草酸盐溶液
37℃热板培养箱
钳子
不锈钢环，比栅格稍大，贴在 1000μl 移液管尖

1. 将含有冰冻切片的凝胶盘放置 37℃ 20min 使凝胶融化，使栅格漂在上面。
2. 用钳子将漂浮的栅格取出，将其放入 100μl PBS/0.15mol/L 甘氨酸中，用新鲜的 PBS/0.15mol/L 甘氨酸漂洗 4 次，每次 3min。
3. 用 PBS/1%BSA 漂洗栅格 2 次，每次 5min。
4. 用 PBS/1%BSA 将一抗稀释至适当的浓度（通常约为 0.2μg/ml，但要求根据每种抗体滴定）在室温孵育栅格适当时间（30～100min）。
5. 用 PBS/0.15mol/L 甘氨酸漂洗 4 次，每次 2min，最后用 PBS/1%BSA 漂洗。
6. 可选做：当一抗未标记蛋白 A 时可做此步骤。加入 100μl 用 PBS/1%BSA 稀释标有蛋白 A 的二抗孵育栅格 20min。
7. 用 100μl 的 PBS/0.1%BSA 漂洗栅格 4 次，每次 2min。用 10μl 溶于 PBS/ 1%BSA 的 10nm 蛋白 A-金微粒孵育栅格 20min。
8. 用 100μl 的 PBS/0.1%BSA 漂洗栅格 7 次，每次 2min。用 100μl 溶于 PBS 的 1%戊二醛孵育栅格 5min。

   对于双免疫金标记，这一步骤后用 PBS/0.15mol/L 甘氨酸洗栅格（第二步）重复整个程序至加二抗，对于双标记实验要用含不同大小金微粒的蛋白 A。
9. 用 100μl 的蒸馏水洗栅格 7 次，每次 2min。

10. 可选做：用 100μl 的双氧根草酸盐溶液孵育栅格 5min。
11. 用 100μl 甲基纤维素/双氧根草酸盐溶液快速洗栅格 1min，再用新鲜的甲基纤维素/双氧根草酸盐溶液洗 5min。
12. 取出栅格。
13. 用滤纸呈 45°角接触环以排出多余的甲基纤维素/双氧根草酸盐溶液，室温空气干燥栅格。
14. 用电镜在 80kV 水平以小缝隙检测的栅格。

支持方案 1 用免疫金标记方法固定细胞

免疫金标记通常用三种不同的固定方法——多聚甲醛（PFA）、戊二醛（GA）或二者的结合（PFA/GA）。研究者最好先确定哪一种固定方法最适于使亚细胞器保持最佳的抗原特性。

材料（带√项见附录 1）

培养基
培养贴壁或悬浮的细胞系
√2×固定液，室温；2×PFA，2×GA，2×PFA/GA
√储存液
橡胶萃取棒
10ml 离心管
螺帽型微量离心管

1. 在实验前一天给细胞换液（70%～80%的贴壁细胞汇合度，非贴壁细胞 1×10^6 个/ml）。
2. 在 5ml 含有贴壁细胞或悬浮细胞的培养基中加入 5ml 2×固定液（固定之前勿洗），室温孵育 24h（PFA）或 1h（GA 或 PFA/GA）。固定期间不要搅动细胞。
3. 对于贴壁细胞：用橡胶萃取棒将细胞刮入 10ml 的培养基或固定液中。
4. 将细胞转入 10ml 的管中，用 1000～2000 g 离心 5min，室温，弃上清。
5. 在 1ml 储存液中重悬细胞沉淀，将细胞装入螺帽型微量离心管中储存，在密闭容器中 4℃储存。

支持方案 2 用免疫金标记方法固定组织

材料（带√项见附录 1）

组织
√1×固定液；1×PFA，1×GA，1×PFA/GA
√储存液
10ml 离心管

有螺帽的玻璃瓶
刀片（干燥空气中，浸泡在乙醇里）
高精度的镊子
解剖显微镜

1. 如果可能灌注固定组织，否则将活体组织、解剖器官或者将胚胎立即放入到盛有2ml的1×固定液的带螺帽的玻璃瓶中，在解剖显微镜下用清洁刀片、高精度的镊子将组织切成3mm×3mm的片。
2. 室温固定组织24h（PFA）或2h（GA或PFA/GA），固定后将组织放入到盛有储存液的玻璃管中，在密闭容器中4℃储存。

支持方案3 免疫金标记方法做冰冻切片

超薄冰冻切片需要花费大量的时间，并被认为是一项艺术，掌握这门艺术需要大量的训练和练习，学习这项技术相当于学习一种为达到职业水平的乐器。然而，一周内可以训练实验者完成这项艺术性操作的有用的准备工作。储存在液氮里的样本可重复使用。

材料（带√项见附录1）

样本：包埋细胞或组织
√溶于0.1mol/L磷酸钠溶液、pH7.4的2.3mol/L的蔗糖溶液（见附录1缓冲液）或2.3mol/L蔗糖溶液与2%（v/v）的甲基纤维素1∶1的混合溶液
在小培养皿中的2%（w/v）的凝胶
带有冷冻室和抗静电装置（Diatome）的超薄切片机
玻璃或钻石刀（Diatome或Drukker）
修剪刀
一端带有小刷子的小木棒
直径1.5mm固定在15cm木棒上的不锈钢取物环
碳-聚乙烯醇缩甲醛和氯醋聚乙烯醇三元共聚物处理的铜栅格（见支持方案4）

1. 将超薄切片机放置在−100℃，按厂商说明将标本和修剪刀放入超薄切片机中，并固定。
2. 用玻璃刀或修剪装置修整样品块，切去边缘小的部分，维持超薄切片机温度在−100℃。
3. 以50mm/s的速度将样品切成0.1μm厚的组织片，旋转样本90°，修剪各边使成0.2mm×0.3mm的长方形。

在此步骤建议检查剩余样品是否适合进一步切成0.25μm厚的切片。可在光镜下挑选（步骤6）和估计。甲苯胺蓝染或免疫组化可以实行．如果必要，可在光镜检查后进一步修块。

4. 对于超薄切割，应使冰冻室、刀柄以及切片机上的样本托的温度保持在－120℃（温度波动应小于1℃）。
5. 以1.6mm/s的速度用干净的玻璃或者钻石刀将样品切成50nm（PFA固定的材料）或65nm（PFA/GA固定的材料）厚度的超薄组织片，将5或6个组织片紧密排列成条。切割过程中，使用小木棒上的小刷子小心展平切片上的卷曲或皱褶，把他们放在钻石刀的砧板上。
6. 用固定在15cm木棒上的1.5mm直径的不锈钢取物环将标本从冷冻室取出，取物环上预先粘有1∶1的2.3mol/L蔗糖溶液和2%甲基纤维素的混合液（比较困难，但优选），或2.3mol/L的蔗糖溶液。将液滴滴至标本条的表面，直到液体连接。

   在结冰前液滴应温和地铺在样本上，保证样本液滴温和地与之连接。
7. 从冷冻室中快速取出携带有标本条的取物环，解冻标本，解冻完全后，将标本放置到经过碳-聚乙烯醇缩甲醛和氯醋聚乙烯醇三元共聚物处理的铜栅格上。
8. 把经过充分地碳-聚乙烯醇缩甲醛和氯醋聚乙烯醇三元共聚物处理的铜栅格放置于盛有2%凝胶的小的培养皿中，此培养皿可储存于另外一个湿的培养皿中，后者放置于冰上，又叫凝胶储存盒，也可以直接用盒子密封后放到4℃保存。

支持方案4　经碳-聚乙烯醇缩甲醛和氯乙聚乙烯醇三元共聚物处理的铜栅格的准备

材料

聚乙烯醇缩甲醛和氯醋聚乙烯醇三元共聚物（Merck）
氯仿，分析纯度
显微镜玻片
带玻璃塞的锥形烧瓶（容量≥100ml）
科普林缸
100孔的铜栅格
标本签
碳涂布机（BOC Edwards）

1. 用指尖（“体脂”）轻擦一张显微镜玻片的表面，然后再用擦镜纸轻擦，保证玻片表面没有灰尘。
2. 在带玻璃塞的锥形烧瓶中将1.1g的聚乙烯醇缩甲醛和氯乙聚乙烯醇三元共聚物加到100ml的氯仿中，搅拌溶解。然后将聚乙烯醇缩甲醛和氯乙聚乙烯醇三元共聚物溶液轻轻转移到科普林缸内。
3. 将玻片全长的70%浸到聚乙烯醇缩甲醛和氯醋聚乙烯醇三元共聚物溶液中2min。
4. 取出玻片（玻片取出的速度决定聚乙烯醇缩甲醛和氯乙聚乙烯醇三元共聚物的厚度，50nm左右最好），自然风干1min。
5. 将玻片慢慢放入盛有蒸馏水的玻璃容器内，并且使玻片上已经涂上聚乙烯醇缩甲醛和氯乙聚乙烯醇三元共聚物并在玻片表面形成薄膜的一面朝上（应呈灰色）。

6. 用洁净的100孔的铜栅格覆盖聚乙烯醇缩甲醛和氯乙聚乙烯醇三元共聚物薄膜，并使栅格的粗糙面对着聚乙烯醇缩甲醛和氯乙聚乙烯醇三元共聚物薄膜。
7. 从玻璃容器中取出已经涂布了聚乙烯醇缩甲醛和氯醋聚乙烯醇三元共聚物薄膜的栅格，把栅格放到一张玻片的表面，玻片的一端贴上白色的标本签，使栅格可以黏着到玻片上。
8. 将栅格自然风干。在电镜下观察涂布了聚乙烯醇缩甲醛和氯乙聚乙烯醇三元共聚物薄膜的栅格检测其是否合格。确保聚乙烯醇缩甲醛和氯乙聚乙烯醇三元共聚物薄膜无尘、无裂缝、孔洞和破损，并且在高能光束（80kV 没有物镜光圈）作用下不分解。
9. 第二天按照设备生产商提供的说明书在高真空条件下把栅格上涂布一层挥发性碳。通过观察涂布过的和没有涂布的标本签能确定涂布的厚度（仅有细微的颜色变化）。

参考文献：Griffiths. 1993；Raposo et al.，1997
撰稿人：Peter J. Peters

（刘书漫　张钦宪 译）

单元 5.8　相关的视频光学/电子显微镜术

基本方案　相关的视频光学/电子显微镜术

这种方法采用免疫金染色法和免疫过氧化物酶染色法来做电镜标本的染色（典型结果见图 5.8.1）。通常免疫金染色法（Burry et al. 1992）常用来标记绝大部分抗原；而免疫过氧化物酶染色法通常仅用来标记那些位于膜包被的小间隔内的抗原，这是因为过氧化物酶反应生成的电子致密产物易从抗体结合处弥散开（Brown and Farquhar 1989；Deerinck et al. 1994）。只有采用免疫金染色法才能标记位于胞质内的 GFP 融合蛋白质的抗原决定簇。此外，HRP（辣根过氧化物酶）标记也适用于其他的抗原决定簇。

值得一提的是，许多用免疫荧光显示结果非常好的抗体在免疫源性电镜染色中不甚理想，因为在多数电镜标本的固定过程中用到的戊二醛很容易与抗原决定簇中的氨基酸基团桥联到一起；然而，若是减少或者不用戊二醛会造成细胞内细胞器的超微结构无法很好保存。如果免疫源性电镜标记行不通，可以采用一些调节手段，例如，优化固定过程中戊二醛的浓度或者换用高碘酸盐、赖氨酸、多聚甲醛固定，这些 Brown 和 Farquhar 描述过不同的固定方法（1989）。

注意：对于 CVLEM 流程中任何一个步骤，找到目的细胞是至关重要的。

材料（带√项见附录 1）

目的细胞
编码一个适当的 GFP 融合蛋白质的 cDNA
√固定剂 A

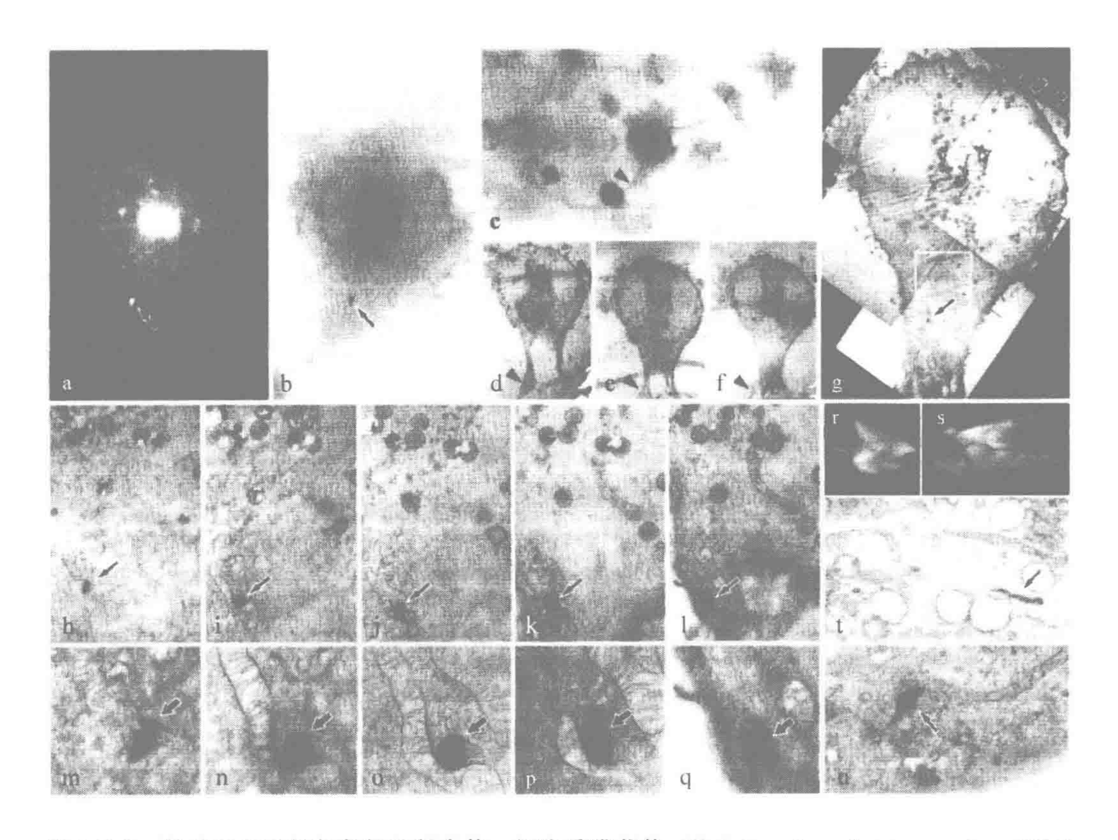


图 5.8.1 用 CVLEM 研究高尔基复合体一细胞质膜载体（Golgi-to-plasmalemma carrier，GPC）的体内动态和超微结构

图片（a）（箭头所示）用时延性共聚焦显微镜在体观察 GPC。固定后，细胞用免疫过氧化物酶标记，环氧树脂包埋。图片（b）中箭头所示的结构是使用计算机辅助的双影像叠影得到的平面显示荧光 GPC，用到了细胞定位坐标，图片（c）是一个例子。一般的免疫过氧化物酶标记（b）与（a）中的疱疹性口炎病毒糖蛋白-GFP（VSVG-GFP）符合。（d）～（f）显示一系列的细胞图片，第一张涂片捕获的是转运介质（g）；箭头所示是在低倍镜下捕获的影像（f），（g）。注意：图片中包含着对辨别细胞有用的结构——如（c）～（f）突起和箭头。h～q 系列平面影像是一系列包含 GPC（箭头示）的不间断的 200nm 厚的细胞涂片。（h）～（i）显示的是（g）中方框所在区域的细胞。三维重建出的 GPC 是一个有短管状突起（r），（s）的拉长的小囊。其他用相同的方法重建出来的 GPC 或者呈现细管状（t）：箭头所示，或者为有短突起的小囊（u）：箭头所示。（u）中的带状结构在其他的图片中显示为以下长度：（a），（b）中 9μm，（c）中 31μm，（d）～（f）中 12.2μm，（g）中 6μm，（h）～（i）中 2.1μm，（m）～（q）中 700nm，（r），（s）中 320nm，（t），（u）中 1.2μm

√固定剂 B

√PBS

√封闭液

标记目的结构的一抗

结合辣根过氧化物酶（HRP；Rockland）或者纳米金（Nanoprobes）的二抗单价 Fab 片段

1%（w/v）戊二醛，溶于 0.2mol/L HEPES 缓冲液中，pH 7.3

√金促进混合物

√DAB 溶液

2%（w/v）OsO_4（Electron Microscopy Sciences）溶于水

√3%（w/v）亚铁氰化钾溶于 0.2mol/L 的甲次砷酸盐缓冲液，pH 7.4

50%、70%、90%和 100%（v/v）的乙醇

√环氧树脂

从柱型模子内做出的 8mm 的树脂柱

35mm MatTek 有盖培养皿，带有细胞定位覆盖片和细胞定位栅格图（MatTek）

倒置荧光显微镜

多光子显微镜、激光扫描共聚焦显微镜或者数码荧光倒置显微镜（通过计算机能获得一系列与时间相关的图像）

60℃烤箱

超微切片机（有样品固定器、玻璃刀和钻石刀）

小刷子

取物环（Agar）

可调节角度的实验夹

涂布碳-聚乙烯醇缩甲醛和氯醋聚乙烯醇三元共聚物支持薄膜的细缝栅格（Electron Microscopy Sciences Agar）

电子显微镜

从一系列切片影像重塑三维结构的软件

1. 将目的细胞以 50%～60%的汇合度平铺到 35mm MatTek 有盖培养皿中，培养皿底部预先贴有覆盖片。
2. 采用适当的方法用编码适当 GFP 融合蛋白质的 cDNA 转染细胞。已经用到的这种 cDNA 有多种，包括编码原骨胶原Ⅰ、甘露糖苷酶Ⅱ和膜口腔黏膜炎病毒糖蛋白(VSVG)-GFP 融合蛋白的 cDNA。如果用电穿孔方法，则颠倒步骤 1 和步骤 2 的顺序。
3. 将培养皿放于倒置荧光显微镜下，选择一个转染的目的细胞，确定其在细胞定位栅格坐标上的相对位置，并在细胞定位栅格图上绘出（照出）其位置。
4. 用多光子显微镜、激光扫描共焦显微镜或者数码荧光倒置显微镜（通过计算机能获得一系列时延性图像）来观察选择的活细胞内 GFP 标记结构的动态变化。
5. 在摄取图像的过程中，如果有感兴趣的图像，则向细胞培养基中加入固定剂 A（细胞培养基/固定剂 A＝1∶1）。
6. 停止摄取影像，细胞在固定剂 A 内放置 5～10min。如果需要，继续摄取一系列细胞影像。2ml 固定剂 B 冲洗细胞并将细胞在固定剂 B 内放置 30min。

纳米金标记法电镜技术

7a. 2ml 的 PBS 冲洗细胞 3 次，每次 5min，然后在 2ml 的封闭液里孵育 30min。

8a. 用封闭液稀释后的一抗孵育细胞过夜（根据抗体浓度稀释，但是应该比免疫荧光显色高 5～10 倍）。

9a. 2ml 的 PBS 冲洗细胞 6 次，每次 2min。用封闭液 1∶50（v/v）稀释结合纳米金的二抗 Fab 片段，并用稀释后的二抗孵育细胞 2h.

10a. 2ml 的 PBS 冲洗细胞 6 次，每次 2min. 1%戊二醛固定 5min，2ml 的 PBS 冲洗细胞 3 次，每次 5min，然后再用蒸馏水冲洗 3 次.

11a. 0.5ml 金促进混合物中孵育细胞 6～10min。2ml 的蒸馏水冲洗细胞 3 次，每次 5min。

HRP 标记法电镜技术

7b. 2ml 的 PBS 冲洗细胞 3 次，每次 2min，然后在 1ml 的封闭液里孵育 30min。

8b. 用封闭液稀释后的一抗孵育细胞过夜（根据抗体浓度稀释，但是应该比免疫荧光显色高 5～10 倍）。

9b. 2ml 的 PBS 冲洗细胞 6 次，每次 2min。用封闭液 1∶50 稀释结合 HRP 的二抗 Fab 片段，并用稀释后的二抗孵育细胞 2h。

10b. 2ml 的 PBS 冲洗细胞 6 次，每次 2min，1%戊二醛固定 5min。2ml 的 PBS 冲洗细胞 3 次，每次 5min，然后在 1ml 的 DAB 溶液中孵育细胞.

11b. 2ml 的 PBS 冲洗细胞 3 次，每次 2min。

12. 0.5ml 2%（w/v）OsO_4 和 3%（w/v）亚铁氰化钾 1∶1 混合溶液冰上孵育细胞 1h.

13. 2ml 的蒸馏水冲洗细胞，然后经过梯度浓度乙醇脱水，在每种浓度乙醇中脱水 10min，如 50%、70%、90%乙醇，在 100%乙醇中脱水 3 次，每次 10min。于 1∶1环氧树脂和乙醇溶液中室温孵育 1～2 h.

14. 在纯环氧树脂中室温孵育 1h，然后放 60℃烤箱内过夜（≥12 h）

15. 取一滴新鲜的环氧树脂滴于培养皿上被检测细胞处。将新鲜的树脂作为胶合剂把被检测细胞粘到 8mm 树脂柱的平底上，然后将这个装置重新放回 60℃烤箱内放置 16 h。

16. 轻轻地反复扳曲树脂柱，从而小心地从有盖培养皿和覆盖片上取出树脂。可在室温下长期保存。

    如果细胞定位覆盖片与包被有细胞的培养基无法分离，用盛有氢氟酸（HF; Sigma）的塑料管孵育标本 30～60min，溶解覆盖片。不能用玻璃管，因为氢氟酸能溶解玻璃。用水冲洗，在立体显微镜下准确监测确保玻片完全溶解。如果玻片没有溶解，用氢氟酸重新处理并用水冲洗。0.1mol/L PBS 或者 0.2mol/L HEPES 缓冲液，pH 7.3 中孵育标本 60min，用来中和氢氟酸，水冲洗，风干。

17. 修整取出的树脂块，使转染细胞位于树脂块的中央，呈 3mm×3mm 的棱锥形。

18. 把棱锥形树脂块放到超微切片机上，与超微切片机的标本弧垂直。确保玻璃刀在合适的位置，并使标本最大限度与之靠近。旋转刀座使棱锥的底面与刀刃面平行并在一条直线上。倾斜样本弧和刀来调节刀刃与样本表面的距离。

19. 将样本朝左或者右移动 90°并修整树脂块的边缘，这样最大限度地削薄棱锥体（宽度＜100μm），树脂块的长轴与刀刃面平行并且转染细胞位于中央。

20. 将样本重新扳回 90°，恰好固定于先前的同一位置。用钻石刀代替玻璃刀，并使刀

刃对准棱锥体。按照超微切片机的说明书做一系列的切割，得到一系列的切片。

非常精确的三维重建切片的厚度应该不超过 50nm，常规切片厚度约 80nm，而电子显微镜 X 射线断层摄影术切片厚度约 250nm。

21. 停止切割，用两个小刷子把切片带分成小片，使之完全适合放入取物环的内环中，并且不人为接触切片带。
22. 收集切片带。具体的方法是：把取物环放到含有切片带的水中，保证切片带完全进入内环并且不人为接触切片带。提出带有切片带的取物环，并且将环固定到靠近显微镜用薄片切片机的立体显微镜的实验钳中，这样在超微切片机的立体显微镜下能观察到取物环。
23. 取一个涂布聚乙烯醇缩甲醛和氯醋聚乙烯醇三元共聚物支持薄膜的细缝栅格，温和地用栅格涂布碳的一面接触水中的切片（不接触取物环）。非常慢地把细缝栅格从环中移出。室温保存栅格。
24. 把细缝栅格放置于电子显微镜下并分辨出转染细胞，用开始几次带有树脂切片的协调栅格的踪迹作为参照。
25. 对一系列的切片拍照，得到连续的照片（或者用带有摄像机的计算机获取影像）直到在光学显微镜下再也观察不到目的细胞。采用专门为三维重建设计的软件，将所有的照片按顺序排成一列，参考软件的使用说明重塑三维模型。

参考文献：Brown and Farquhar，1989；Burry et al.，1992；Deerinck et al.，1994；Tokuyasu and Mather，1987

撰稿人：Roman S. Polishchuk and Alexander A. Mironov

（刘书漫　张钦宪 译）

单元 5.9　活细胞内微管和肌动蛋白丝的荧光斑点显微镜技术（FSM）

本单元着重描述一种反射荧光显微镜技术，又称为荧光斑点显微镜技术（FSM）的具体操作步骤。这种技术能使体内和体外大分子组合的旋转、运动、组装与拆卸动力学过程达到可视化。得到成功的活细胞 FSM 影像最关键的因素包括：合适的荧光蛋白浓度、照片褪色的成功抑制和高质量、充分标记的全功能蛋白质。

计划策略

概要

开始采用 FSM 照相前，必须准备好高质量的荧光标记蛋白。在 FSM 实践中效果不错的标记蛋白能很经济地从细胞骨架中提取；然而，如果要在实验室里观察细胞骨架动力学的成像过程，人工合成标记蛋白就比较实惠了。而且，必须得到微管蛋白（单元

15.1)，这就需要有新鲜的猪脑或者是牛脑供应。并且，需要有肌丙酮粉的供源。Sigma 生产丙酮粉，不过，专门研究肌动蛋白生物化学的实验室能提供质量更好的丙酮粉。还可以用 Pardee 和 Spudich 的方法（1982）制备丙酮粉。

荧光物质的选择

选择 FSM 成像荧光物质的激发和发射光谱时必须牢记两点：第一，特定波长对细胞的光损害效应，如短波（<450nm 或者 500nm）和超过可视范围的光波（>700nm）都可以致敏甚至损害细胞；第二，内源性的细胞自发荧光。降低光损害效应，最好的选择就是黄/橘红（570～600nm）、橘红/红（600～630nm）或者深红色的发射染料。其中，长波激发物更好，尽管有些染料，如 Cy-5 难以用肉眼观看因此无法采用。本书作者实践 FSM 最成功的经历是用了 X-罗丹明、Alexa568 或 Texas red 荧光团。

基本方案 1　设计一个时延数字化 FSM 显微镜系统

材料

生物研究质量级显微镜台，有足够的重量能抗震（可能的情况下放在一张防震桌上）

正立或倒立反射荧光显微镜和光学设施包括（图 5.9.1）：

- 反射照明器（可人工控制的中心和场光圈大小；筛选中间密度的细缝和红外滤光器）
- 高倍物镜头（如 60×、63×或 100×）
- 激发滤光器，发射滤光器和双色镜
- 电子控制的遮光器
- 冷却式 CCD 相机
- 计算机，带有数字化图像捕获插件以及控制快门和图像捕获的软件

1. 显微镜座台不能随温度热胀冷缩，聚焦系统要求高质量，并且能够在长期的时延图像捕获过程中固定焦点以避免人工物象。
2. 显微镜应该装备高质量的反射照明器，包括一个 100W HBO 的汞弧灯，一个装有反光镜的灯，能够人工调节灯泡的亮度和 Koehler 反射照明同轴反射中心。
3. 物镜头应尽可能具有最高的分辨率，例如，配有高数字化的光圈（1.4NA 油镜）

   记住 60×或者 63×的镜头转移光线的效率比 100×的镜头较高。然而，不能因为这个优点而忽略了系统的清晰度。镜头不应该有形成对比的因素，例如，能阻断光子传送的相位环，还应该校准镜头不能产生异彩（高度消色透镜），并且还应该高效传送捕获的光波。这些因素决定于荧光物质的选择。关于镜头光谱效率的信息掌握在制造商手中。

   当捕获一个小标本时，不可能平场校准镜头（平面校准）。确实，通常专门为外荧光（Super Fluor-、Nikon；Fluor-或者 Fluar-透镜）设计的物镜不是平面校准的，因为这种校准给透镜增加了玻璃成分，玻璃成分越多，丢失光子的地方越多。然而，

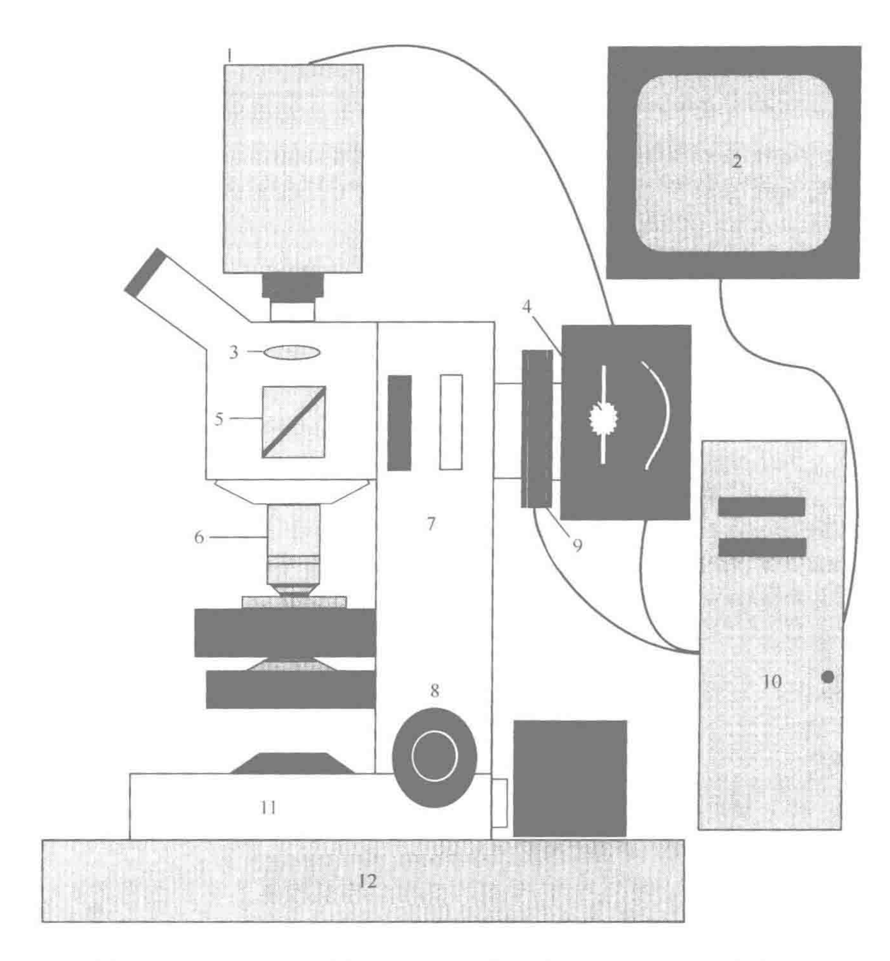


图 5.9.1　正立 FSM 成像系统基本结构简略图（详情见基本方案 1）

1. 低噪音、高动力范围的冷却式 CCD 相机　2. 显示屏　3. 放大倍数变换器　4. 中央弧和镜子　5. 高效荧光滤过设备　6. 1.4-NA100×或者 10×油浸物镜　7. 中间密度的场光阑　8. 聚焦锁 9. 电子遮光器　10. 快速处理器，>356MB RAM，CD-RW，图像捕获板，分析软件　11. 稳定的显微镜座台　12. 防震桌

在一个平而宽的视场中，作者用 DIC-级别平面高度消色物镜取得了很好的效果。

4. 高效率的激发和发射滤光器以及双色镜要保证荧光物质的激发、从发射过程中分离激发态以及收集选择的荧光物质的发射（使用长效滤光器比通效滤光器能提高效率）。
5. 从物镜到检测器的距离应尽量小并且尽可能避免干扰因素，以确保捕获最大量的光子。移走分析器、波盘和在各种类型偏振显微镜技术中都应用的 Wollaston 棱镜，最好也要移走变倍器和放大装置；然而，如果显微镜的分辨率要与检测器的分辨率匹配（见下）就不得不忍受干扰因素的存在。
6. 照相机的镜头应该放置在离标本最近的位置。对于直立式显微镜，可以放在物镜的正上面；而对于倒置显微镜，则放在显微镜下面的底部镜头（Keller）上最好。从光路上移走棱镜，因为棱镜劈开了目镜和照相机镜头之间所成的像。

下面放置镜头需要桌面上有一个孔的桌子，显微镜能够放置到孔上与照相机协调。如果这个要求达不到，考虑把照相机放置于显微镜的旁侧，此时需要一面镜子把影像直接反射到相机上，这比前置相机要好，因为前置相机至少需要两面镜子。

7. 电子控制的遮光器必须配备适当的适配器，适配器放在灯室与反射照明器之间的光路上，并且对着灯泡的一面要能被镜子映出，把热从标本反射出去。
8. 操作遮光器必须静、快、稳，不能过分地颤动。通过计算机系列或平行的端口得到软件激发的脉冲调节的遮光器。
9. 照相机必须是科研级的慢扫描冷却式 CCD 相机，不能替换成装配有冷却设置的视频 CCD 相机。照相机的选择实质上包括 CCD 芯片本身及其存在位置即照相机电路的选择（不同的相机厂家均有各种配件；详细信息参见 Inoue and Spring，1997），芯片放在电路中。
10. 空间分辨率：CCD 芯片上硅光敏二极管（像素）的大小决定成像的空间分辨率。目前标准的尺寸一般是 6μm×6μm～30μm×30μm。像素越大，为保证图像的分辨率，对显微镜的放大倍数要求越高。这样，小像素更适合 FSM，因为小像素不要求光路上放置光子放大装置或者变倍器。构成 CCD 的总像素和像素的大小决定了成像面积。
11. 光谱灵敏度：不同类型的 CCD 有特定的概率，也就是在一定波长的光波作用下把光子转化成为光电子的概率，后者类似于照相机接收的信号，即量子效率（QE）。厂商为其所生产的 CCD 提供了波长对 QE 的曲线图。对于荧光物质的选择，必须选择一个有光谱灵敏度的 CCD。
12. 光照几何学：CCD 可以从前方或后方照亮，前方照明要求光源通过介质到达光敏区，降低 QE；后方照明的 CCD 很薄，光可以直接投到光敏区的背侧，进一步提高其敏感度（同时也更易碎，更昂贵）。然而，因为 CCD 变薄，像素的大小就有了一定的限制，通常大约在 25μm×25μm，现行可用的最小的尺寸在 13μm×13μm。因此，就不得不衡量敏感度的增加是否值得在光路上增加变倍器，以及能否承担起这笔费用。在 FSM 的应用中，敏感的前照明 CCD 工作效果很好。
13. 输出几何学：一旦光子被转换成为像素组合中的电荷，就必须马上把电荷输出给图像获得板，然后才能在计算机内通过给每个像素相对应的电荷指定一个灰度值来重建图像。电荷通过三种基本的途径转移出 CCD。当像素电荷一排接着一排地按顺序转移出 CCD 时，进行全框输出（最慢，干扰也最严重）。这种输出方式在其他的照相机电路配件不产生干扰的情况下可以用于 FSM。在框输出（比较昂贵）和插入输出 CCD 时，全部的像素电荷组或者是整排像素被快速地转化成一组避光的像素（比全框输出较快，干扰也较小）。然后，把电荷从避光区输出，同时把成像区再曝光。插入输出 CCD 分辨率较低，不过近年来这个问题已经得到克服。所有的三种方式都可以用在 FSM，但是比较起来，插入输出 CCD 输出速度增大能够提高图像捕获率，适用于观察活跃增殖的细胞或者是微管的动态活动。
14. 温度：在预算范围内应当选择拥有最低温冷却系统的 CCD。光敏二极管能将 CCD 上的热能转化为光，干扰成像。不同的照相机生产商会在拥有不同冷却程度的照相机内放上同一种 CCD，制冷差异从室温下 20℃ 至 －50℃ 或者 －60℃。不要选择最

便宜的 CCD，因为热是一个不可避免的干扰源，能很容易地吞没非常微弱的 FSM 信号。

15. 输出速度：通常，输出速度越快，在电荷转移过程中发生的错误（干扰）越多。现在的照相机速度从 100kHz（低干扰后照明相机）到 14MHz 或者 15MHz（插入和框输出照相机）不等。对于高质量的 FSM 细胞骨架动力学成像，需要的图像捕获率为 1 或 2 个图像/秒。应在高速度和低干扰之间寻找一个合适的平衡点，不推荐买速度低于 1MHz 的照相机。
16. 动力学范围：对于一个确定的 CCD，尽管每种像素在电荷饱和前能结合的光子总量是一定的，但计算机对于电荷排布后的灰度值是不固定的。每一个像素涵盖的信息单位可以是 8、10、12、14、16 比特，对应的灰度值分别是 256、1024、4096、16 384或者 65 536（如 $2^8=256$）。对于 FSM 成像中非常模糊的标本，动力学范围最大化非常重要（在适当的预算内）。遵照这个原则，在运用的极小的动力学范围内应该有较精细的灰度梯度。尽管推荐≥12 比特/像素，但应用 10 比特/像素的相机即可获得成功的 FSM 图像。
17. 提取字数组和集合：在拍摄一个细胞的小部分区域时，仅输出特定部分的 CCD（提取字数组）可以增加图像的捕获速度，但这并非必须。FSM 不能把一组像素携带的电荷结合起来作为一个单独的像素读出以增加敏感性，因为这种方法有效地增加了像素大小并且降低了 CCD 的分辨率。
18. 应该使用具有最快的处理器和随机存储器（RAM）的计算机。时延 FSM 系列图像是很大的文档，常常≥100MB，所以，计算机足够的“马力”是观看和调整这些图像的必要条件（本书作者推荐≥356MB）。
19. 文档存储：一张紧密的读/写光盘（CDR/W）是存储时延 FSM 图像大文档最经济的设备。选择可用的最快的读写速度。
20. 用相机和软件制造商推荐的图像捕获板，确保图像捕获板能处理相机的色彩深度。许多相机都有各自的图像捕获板。
21. 要求软件能用来捕获时延数码图像，在相机曝光过程中能启动快门，能像看电影一样很容易地观看时延系列图像，能控制回放率，可以调节亮度和整个系列图像的对比度。还要求具有基本的图像处理能力，包括低通滤过的能力和图像运算（如削减、倍增）能力。软件还要能够行使密度、位置和距离的定量分析。

    本书作者使用 MetaMorph（普通成像），效果非常好。不过，NIH-成像免费软件（http://rsb.info.nih.gov/nih-image）用途也很广泛并且有很多的免费工具可以用。

22. 实际获取荧光斑点的分辨率限制性图像的关键是使显微镜和检测仪的分辨率相匹配。需要在 CCD（Nyquist 样本标准）上放大衍射限制的斑点到 3 个像素大小，以使 CCD 不限制成像系统的分辨率，或像素之间产生混淆。基于这个原理，任何倍数的放大都不会包含更多的信息，而仅仅减少了捕捉标本的面积。所需的放大倍数（M）可以用公式 $M=3\ (P_{\text{width}})\ /r$ 表示，P_{width}代表 CCD 上像素的宽度，r 代表衍射限制斑点的大小。由此，分辨率是 0.27μm 的红色荧光，和像素是 6.7μm 的相机，要求符合 Nyquist 标准的放大倍数是 74.4×，那么，需用一个 100×的物镜或

者一个 60×物镜配一个 1.25×的变倍器，变倍器可以传输更多的光。

基本方案 2　活细胞内细胞骨架的时延 FSM 成像

材料（带√项见附录 1）

0.5mg/ml 标记的细胞骨架蛋白质（微管蛋白或者肌动蛋白，分别见支持方案 1 或 2）

培养的组织细胞，生长在 22mm×22mm 的玻璃盖玻片上，放在小的塑料有盖培养皿中

√Valap

√缓冲滤过培养基

Oxyrase EC（Oxyrase 公司）

显微超速离心机（Optima TL 或者 TLX，Beckman Instruments；或者 Discovery M120，Sorvall）

6ml 的显微离心管

微量超速离心机上用的旋翼式转子，带有能容纳 0.6ml 的微量离心管的筒套（Beckman TLX-55 的转子，用标准厚壁 1.4ml 聚碳酸酯管；而 Sorvall 转子用一般的筒套即可）。

√显微注射针

微量移液管（Eppendorf 或者类似物）或者细径注射器（很细，可以与显微注射针的膛孔吻合，Hamilton）

单细胞显微注射系统，背压可控制在 0.1～20 psi，有注射单细胞的精确显微操作仪，安装在倒置显微镜上，显微镜配备有长工作距离相差聚光器和一个 40×的干式相差物镜，物镜的工作距离足够长可以穿过塑料有盖培养皿和盖玻片聚焦。

FSM 成像系统（见基本方案 1）

显微镜载物台培养箱（如固定在显微镜载物台上的装有可变电阻器和温度计的吹风机；可选择）

Scotch 双面胶带（3M）

1×3in. 玻璃显微镜载（物）片

棉签

1. 冷却微量超离心机和转子到 4℃。吸取 3μl 0.5mg/ml 的细胞骨架蛋白，迅速解冻后立即放在冰上。

　　如果细胞内荧光蛋白质的浓度太高，则不能采用荧光斑点方法。尽管按照推荐用的显微注射浓度操作效果很好，但最终进入细胞内的蛋白质的量是由显微注射技术决定的。微管蛋白可以用 IB 稀释，肌动蛋白可以用 G 缓冲液稀释，从而减轻细胞过亮的问题，也降低了荧光蛋白质的浓度。相对地，如果标记蛋白质的浓度太低，相机捕获一张图片所需要的曝光时间将延长，可能造成图像发生人为移动。提高显微注射浓度可以很容易地解决这个问题。

2. 颗粒化标记样本中的不溶性蛋白质。剪去盛有标记蛋白质的 0.6ml 显微离心管的盖子并把离心管放到旋翼式转子的筒套内。77 000 g，4℃，离心 20min。
3. 在微量超速离心的同时，用一个 40× 的相差物镜（制造商针对 no. 1.5 的盖玻片作了校正）定位培养的组织细胞（优先选择形状扁平、大且扩展良好的细胞；例如，观察有丝分裂的 PtKI，观察细胞运动的 Swiss 3T3），在显微镜载物台上做显微注射。
4. 微量超速离心后，快速将蛋白质溶液转移到冰上。
5. 用微量移液管或者细径注射器吸取 0.5μl 的蛋白质溶液至显微注射针中（不接触蛋白质溶液中的球形不溶颗粒）。
6. 用大约 0.5～1.5 psi 恒定压力（不要不断地增大压力）操作显微注射针，对盖玻片中央的几个细胞进行显微注射。然后把细胞放回 37℃，5%CO_2 培养箱中 1h，使细胞从显微注射中恢复并且允许标记蛋白整合到细胞骨架中。
7. 孵育细胞的同时，将滤过培养基置于 37℃水浴，融化的 Valap 置于底部的一张热板上；打开显微镜、照相机以及显微镜载物台上的培养箱（仅温血动物的细胞需要），调节温度平衡。
8. 放置标本以前，准备 1ml 含有 20～30μl Oxyrase EC（依经验而定）的缓冲滤过培养基。
9. 制作标本槽：将两条 3mm×30mm 的双面胶带条并排放置在一个 1in×3in. 玻璃显微镜载（物）片内，相互间隔 1cm，形成一个与玻片长轴平行的标本槽。
10. 从有盖培养皿中取回带有显微注射后细胞的盖玻片，将盖玻片的背面和要放到双面胶带条上的边风干，然后把盖玻片放到双面胶带条上，有细胞的一面朝下，这样，盖玻片上含有细胞的区域就放在了双面胶带条之间。放置好盖玻片，使盖玻片与双面胶带条之间完全密封。
11. 加含有 Oxyrase 的滤过培养基到标本槽中，边加边吹打双面胶带条之间的盖玻片。吹打的同时在标本槽的另一端放上滤纸通过毛细吸引作用抽吸培养基，通过这种方式把培养槽内的培养基置换几次。

    吹打的时候一定不要把气泡吹到标本槽内，因为标本槽内气体的出现会引起光漂白的问题。
12. 小心地风干标本槽的边（不能产生气泡），用一个棉签沾上融化的 Valap 涂到盖玻片的周边，使盖玻片与载玻片完全黏结。
13. 在显微镜的载物台上把玻片调节到合适的温度（10～15min）。熄灭室内的灯让眼睛适应黑暗。
14. 用外荧光光源定位荧光注射细胞。

    细胞可能发出很微弱的荧光，用低效能、低 NA 的物镜头看不清细胞，所以必须用油镜头。细胞定位之后，转换到高倍、高 NA 的物镜头。此时，要格外注意标本的照明和引起的光漂白，注意观察，尽可能把焦点对准一个细胞，调节到视野中心，然后快速关闭光源。在调焦和对中心的过程中，用中密度滤光器削弱外光源也可能有助于保存标本中的荧光物质。

    细胞核中没有细胞骨架的聚合体，核发荧光的细胞可能是死细胞。个别发出微

弱荧光的微管蛋白用肉眼也可看到，而发出荧光的肌动蛋白在细胞内分布相当弥散，可能在应力纤维中更明亮。

15. 挑选出一个相对很暗淡的细胞开始拍照，因为显微注射可能引起细胞荧光亮度的变化。调节外光源的场光圈，仅仅照亮目标区。
16. 优化曝光时间。首先，相机要尽可能调节到最大动态范围并且把影像显示调节到自动转换状态。由于 FSM 影像只用相机动态范围末端的很小一部分，因此若没有自动转换功能，最终捕获的影像可能都是黑色的。选择 500～1000ms（正立显微镜可能需要 2000ms）“暗视野拍照”，即把照明光关闭情况下拍照，来检测照相机的背景灰度。使照明光关闭，与相机曝光同步。捕获完全光照标本（不用中密度滤光器）的影像，尽量使标本信号在灰度值上超出背景 10%，例如，如果 14 比特相机（16 384 灰度水平）的背景灰度是 500，就要求曝光达到的标本灰度为 550。

    光损伤的信号包括细胞运动的终止、细胞突起的消失和有丝分裂进程的阻断。

17. 优化焦距。曝光的同时稍加调节细调，直到看到最好的荧光聚焦斑点再锁定焦距。

    如果肌动蛋白网未呈现荧光斑点，或者个别的微管未延伸出现连续的标记，说明细胞内标记蛋白太多，则寻找另外比较暗淡的标记细胞。

18. 捕获时延系列图像。对于肌动蛋白的运动，每 10～30s 捕获图像；对于微管动力学及其运动，以每 3～10s 的间隔捕获图像，直到满足需要或出现光漂白再停止捕获图像。

基本方案 3　时延 FSM 系列影像的定性和定量分析

材料

FSM 影像捕获系统（见基本方案 1）
镜台测微计（Fisher）
图像分析软件

1. 用图像捕获专用物镜头捕获 10μm 的镜台测微计的图像。校准像素-距离转化因子（即 10μm 内像素的数量；大部分软件包允许输入此类参数，以便测微计报告测量结果）
2. 调整系列影像的亮度和对比度，将荧光斑点扩到最大。
3. 像播放电影一样播放时延系列影像，注意观察荧光斑点的运动、外形变化和其消失的过程。
4. 为了增强 FSM 成像，在时延系列影像的每一张图像上（Waterman-Storer et al. 1999）运用一种“平缓消光”滤光器（例如，通过在图像上增加一个常数为 0.5 的 9×9 或者是 10×10 的低通过滤光器，可削减原来图像反射的光）。
5. 为了测量斑点在复杂的荧光斑点场中的运动速度，例如，迁移细胞的有丝分裂纺锤体或富含肌动蛋白的细胞层，需要做波动曲线和分析（Waterman-Storer et al. 1999）。

    在图像系列中进行斑点运动波动曲线分析的方法有两种。第一种方法，在影像堆

中画出一个窄矩形箭头，矩形的长轴与斑点运动的方向在一条直线上，而斑点运动的方向通过如同放映电影观看系列图像确定。矩形的宽应该是 2～4 个像素，长度应适合做位移分析。拷贝时延系列图像中每个图像感兴趣的区域，将它们并排粘贴组合，形成波动曲线图形。肉眼观察，矩形区内沿矩形长轴移动的斑点在波动曲线上产生倾斜的白线，其斜率反映出斑点运动的速度。这种方法的缺点是只测量了水平或者垂直方向上斑点的运动。

第二种方法需要有代替波动曲线记录分析功能的影像处理软件。MetaMorph 系统就是一个例子。用 MetaMorph 系统的点线描绘功能沿着斑点运动的方向在任何方向画出一条线，用作时延系列图像中第一个影像的运动分析。这种方法的优点是描绘的线能随运动轨迹的变化而随意弯曲。MetaMorph 样本的常规波动曲线显示系列中的每个影像的像素密度值都沿着曲线分布，如果把这些密度值剪接组合成图像，水平方向是沿着线测出的像素值，而垂直方向是接下来的时延系列图像绘出的线。用测微计校正水平方向的位移，而垂直方向的位移的校正必须参照时延系列图像捕获的总次数和图像数目。例如，如果每 10s 捕获一次影像并且一个系列里有 50 张影像，那么波动曲线的垂直位移就必须与 500s 相对应。速度由波动曲线上斑点运动的倾斜轨迹的斜率决定。

6. 通过在每个时延系列图像框架中测量某一斑点离开其零时刻位置的距离（用一些软件，像 MetaMorph 的“追踪点”，能半自动化地完成这个使命；现在正在开发完全自动化的软件），用单一斑点运动轨迹追踪单个细胞骨架多聚体的运动。做位移相对于时间的回归分析可以计算出瞬时速度（从时延系列图像框架 n 到框架 $n+1$ 距离的变化）或者是平均速度。
7. 测量荧光斑点的寿命，从而得出细胞骨架微丝的寿命值，即其转化率。

理论上，每个时间点都能记录下荧光斑点中心单一像素的密度值，可以根据这种“荧光生命史”确定斑点的寿命。然而，由于存在光漂白、影响斑点密度的焦点移动和活标本中斑点的微小运动等问题，这一点当前还很难做到。不过，试图把这些问题都考虑进去的影像分析软件目前正在开发中。

支持方案 1　FSM 荧光标记的微管蛋白的制备

这种方法需要大约 7h，能产生 10mg 标记的微管蛋白，这种标记蛋白可以在 −80℃ 冻存 6～8 个月。关于微管蛋白生化特性的更多信息参见单元 15.1。

材料（带√项见附录 1）

溶于柱缓冲液中经磷酸纤维素纯化的微管蛋白 10ml 装（CB；40～60mg 的微管蛋白；单元 15.1）

√CB/BRB-80 转化缓冲液

√100mmol/L GTP

甘油

√标记缓冲液

√高 pH 缓冲液
√淬火剂
√低 pH 缓冲液
选择性琥珀酰酯衍生物荧光探针
无水的二甲基亚砜
√注射缓冲液（IB）
√10×和 1×BRB-80
√1mol/L $MgCl_2$
37℃水浴锅
100ml 和 10ml 量筒
封口膜
超速离心机和 Beckman70.1 钛转子（或者等效物），13.5ml 带螺帽的聚碳酸酯试管
人工吸液管泵型吸液管（VWR 或者等效物）
微量超速离心机（Beckman Optima TLX with TLA-100.4 转头或者是 Sorvall RC M120 GX with S100AT4 转头）
5.1ml 聚碳酸酯微量超速离心管
7ml 带 B 型槌的杜恩斯匀浆器
带小容量石英比色杯的分光光度计
0.6ml 防紫外线微量离心管

1. 把试管浸到 37℃水浴锅内，解冻 3 或 4 支 10ml 装经磷酸纤维素纯化的微管蛋白（解冻 CB 中的柱子；单元 15.1），轻轻地连续摇动试管直到完全解冻。只要溶液解冻，马上将试管转移到冰上，并将溶液倾倒入 100ml 的量筒中，放在冰上。
2. 微管蛋白溶液中加入 1/20 体积的 CB/BRB-80 转化缓冲液和 100mmol/L 的 GTP 至终浓度为 1 mmol/L。使微管蛋白和 GTP 在冰上结合 5 min。
3. 加 1/3 体积的甘油，用封口膜封住圆筒，轻轻地倒置混合均匀。37℃水浴 40min，使微管蛋白聚合（水浴箱的液面和圆筒的液面平齐），每 10min 混匀 1 次。
4. 在孵育过程中，预热超速离心器和转子（可以用防水的塑料袋包起来浸入水浴箱）、标记缓冲液、高 pH 缓冲液、淬火剂、低 pH 的缓冲液及几个 13.5ml 的带螺帽的超速离心聚碳酸酯试管至 37℃。
5. 孵育到最后的时候，把 3ml 预热的高 pH 缓冲液加到每个预热的 13.5ml 的带螺帽的超速离心管中。使用一个手动移液管沿着超速离心管壁慢慢地滴下微管蛋白溶液，慢慢地把聚合的微管蛋白铺在高 pH 缓冲液上，注意不要把微管蛋白和浓的高 pH 缓冲液混合到一起。把微管溶液均匀的分到每个超速离心管里。在 0.01g 范围内平衡成对的超速离心管，记得包括离心帽。
6. 185 000 *g*，37℃超速离心微管 1h。
7. 超速离心过程中，在一个 1.6ml 微小离心管中制备 100mmol/L 的荧光素标记的琥珀酸霉素酯衍生物溶于无水的二甲基亚砜溶液。把溶液加热到 37℃并尽可能的混合均匀。

8. 在微管超速离心过程结束之前，室温条件下，以最大的速度微量离心溶解的荧光素溶液数分钟。快速收集上清，把它转移到 1.6ml 的微量离心管里。
9. 超速离心后，注意每支离心管中透明或者珍珠般的沉淀物的位置。吸取上清到高 pH 缓冲液高度的一半，用 1～2ml 预热的标记缓冲液清洗高 pH 缓冲液。完全吸弃上清，用 1ml 预热的标记缓冲液轻轻地漂洗沉淀，弃上清。立刻在每个离心管里加入 500μl 预热的标记缓冲液，把离心管放入 37℃的水浴中。
10. 用移液管吸取预热的标记缓冲液（至少 300μl）上下吹打，使沉淀悬浮。避免起泡，并且不要把尖端插入沉淀中。当吹打一个沉淀的时候，剩下的离心管仍然保持在 37℃水浴中，所有的离心管使用同一个枪头，末端截掉 5mm。
    注意：仔细和彻底的重新悬浮是高效率标记的关键。
11. 初次用 500μl 缓冲液漂洗之后，收集 37℃水浴中重新悬浮的细胞沉淀。重复用 300μl 预热的标记缓冲液彻底漂洗试管。把所有的细胞沉淀集中在 2～3ml 的液体里，放在 37℃的水浴中。
12. 把荧光染料加入重新悬浮的微管蛋白溶液中（步骤 8），至终浓度为 10mmol/L，轻轻旋转混匀后，37℃孵育 30min。在整个标记反应过程中，每隔几分钟轻轻旋转混匀，注意不要让溶液起泡沫。
13. 在标记孵育过程中，把带有 5.1ml 聚碳酸酯管的微型超速离心器和转子加热到 37℃。
14. 加入等体积的淬火剂结束标记反应。
15. 把 1ml 的低 pH 缓冲液加入至每一个 5.1ml 微型超速离心管中，并在微型超速离心管的液面上铺 2ml 聚合体。37℃，2 000 000 *g* 超速离心微管 30min。
16. 离心过程中，在冰上冷却 7ml 的杜恩斯匀浆器、乳槌和 10ml 的注射缓冲液（IB）。加热几毫升的水至 37℃。
17. 离心后，吸取 1/2 体积上清，用数滴预热的蒸馏水洗涤缓冲液，然后吸取剩余缓冲液。
18. 迅速在每个管中加入 500ml 的冷 IB。在冰上孵育 10min 使细胞沉淀重新悬浮之前开始解聚（在微型超速离心管里不要尝试使之完全悬浮，不要起泡沫）。收集部分重新悬浮的细胞沉淀加入至杜恩斯匀浆器中，置于冰上，另加入 200μl 冷 IB 洗涤每一个管，收集。
19. 微管在冰上解聚 30min，使槌在匀浆器中缓慢地上下运动。不要起气泡并保证匀浆器始终在冰上。
20. 在解聚的过程中，使微型超速离心器、几个 5.1ml 微型超速离心管以及转子冷却到 2℃。
21. 把重新悬浮的细胞沉淀移入预冷的 5.1ml 微型超速离心管中，2℃，415 000 *g*，超速离心 10min，纯化解聚的微管蛋白。
22. 把上清收集到 10ml 量筒里。加上 1/10 体积的 10×BRB，1 mol/L 的 $MgCl_2$ 至终浓度为 4mmol/L，100mmol/L 的 GTP 至终浓度为 1 mmol/L，最后加 1/3 体积的甘油。倒置混匀。
23. 量筒用封口膜封上放在 37℃的水浴中孵育 45min，间断地晃动量筒，使微管蛋白

聚合。

24. 在孵育过程中，把转子、微型超速离心机，把 2 个 5.1ml 微型超速离心管加热到 37℃。
25. 在孵育结束之前，每个预热的 5.1ml 的微型超速离心管中加入 0.5ml 低 pH 的缓冲液。孵育后，把聚合的微管蛋白铺在每个低 pH 的缓冲液中。
26. 37℃，200 000 g，超速离心微管 30min。在超速离心过程中，冰上冷却 5ml IB，加热 5ml 1×RBR-80 到 37℃。
27. 超速离心后，吸取 1/2 体积的上清，用几滴预热的 1×RBR-80 洗涤两遍缓冲液，完全吸取上清，1×RBR-80 轻柔的洗涤沉淀 2 遍以去除残留的甘油（显微注射入细胞后有细胞毒性）。
28. 在重新悬浮之前，用 200μl 预冷的 IB 覆盖细胞沉淀。在此期间，把转子、微型超速离心器冷却到 4℃。
29. 用移液管取 300μl 的 IB 至每个管中，重新悬浮细胞沉淀，另外再用 100μl 的 IB 洗涤细胞沉淀。把重新悬浮的细胞沉淀（应该很容易悬浮）收集到一个干净并且预冷的微型超速离心管内，用封口膜封住离心管。
30. 在冰上孵育 30min，解聚重新悬浮的微管蛋白。
31. 4℃，415 000 g 超速离心 30min 纯化重新悬浮的微管蛋白。
32. 超速离心后，把上清转移到另外一个放置在冰上的 1.6ml 的微型超速离心管中。
33. 计算微管蛋白的浓度、荧光染料-蛋白结合率和制备产量百分比。在 278nm 处用水作为空白对照，测量 1∶100 稀释的微管蛋白溶液在 278nm 处及在石英杯中激发最大的荧光效应时的吸光度，以水作对照。计算微管蛋白的浓度，微管蛋白的浓度=稀释倍数×A_{278}/ε，对于微管蛋白来说，ε=115 000mol/L/cm。
34. 同样地计算荧光染料的浓度，使用生产商提供的激发系数 ε（可以和技术支持部门联系），计算出荧光染料-蛋白结合率，制备产量百分比。计算标记的微管蛋白总量的毫克数（从浓度和体积获得，微管蛋白质二聚物的分子质量是 110kDa）。
35. 用 IB 调整标记的微管蛋白的浓度至 20～30mg/ml，0.6ml 防紫外线微量离心管中分装 3μl 冷冻的标记蛋白，放入－80℃的液氮中储存。
36. 如果用于显微注射，快速解冻一支分装的高浓度标记微管蛋白，迅速转移到冰上。用冷 IB 稀释到 0.5 mg/ml，3μl 分装的标记蛋白解冻后的使用期限是 2 周。

支持方案 2　FSM 荧光标记肌动蛋白的制备

这个方案总共需要 7 天的时间并且能够生产出 20～30 mg 标记的肌动蛋白，－80℃可以保存超过一年的时间而不降解。参考 Pardee 和 Spudich（1982）关于肌动蛋白聚合的讨论。

材料（带√项见附录 1）

肌肉匀浆（兔腰肌或者鸡胸肌）和丙酮的混合物

√1 mol/L KCl

√1 mol/L $MgCl_2$

√100mmol/L ATP

选择性荧光探针的琥珀酰酯衍生物，预平衡至室温。

无水的二甲基亚砜

√新鲜配置的 1mol/L 的重碳酸钠

√1mol/L NH_4Cl

√G 缓冲液，4℃（用之前新鲜加入 ATP）

预冷的超速离心机和转子（如 Beckman70.1 钛转子）

13.5ml 带螺帽的超速离心管

50ml 和 1L 的量筒

分光光度计和石英杯

1.6ml 超速离心管

铝箔

预冷的离心器和转子（如 Sorvall SS-341 转子）

50ml 无盖的聚碳酸酯离心管

7ml 带 B 型槌的杜恩斯匀浆器

√预先处理过的没有甘油的纤维素分离管

分离管夹子

6ml 的防紫外线微量离心管

1. 把 1g 的肌肉丙酮匀浆放入 50ml 的烧杯中，并加入 25ml 预冷的去离子蒸馏水。通过混合的方法在 4℃抽提肌动蛋白单体。在抽提的过程中，把超速离心器和转子冷却到 4℃。
2. 转移到 13.5ml 的超速离心管中（在 0.01g 范围内成对配平），4℃，185 000 g 超速离心 1h 纯化提取物。
3. 离心后，用 50ml 的量筒小心地收集上清液。1∶10 稀释溶液后用肌动蛋白的消光指数 ε=0.62mol/L/cm（见支持方案 1，步骤 35）来测定其在 290nm（A_{290}）处的吸光率，从而确定初始肌动蛋白单体的量。
4. 加入 1mol/L KCl（终浓度为 0.1mol/L），1mol/L $MgCl_2$（终浓度为 2mmol/L），100 mmol/L ATP（最后的浓度为 1 mmol/L）聚合肌动蛋白。转移入 50ml 的烧杯，室温搅拌 30min。
5. 在聚合过程中，在 1.6ml 的超微离心管中用无水二甲基亚砜溶解荧光素，使终浓度达到 100 mmol/L。加热荧光素溶液 10min，使达到 37℃，充分旋转混合均匀。
6. 室温，以最大速度离心荧光素溶液 5min。迅速把它转移到一个新鲜的 1.6ml 的微型离心管中，室温放置。
7. 聚合后，为了标记反应，加入 1/5 体积的 1 mol/L 的重碳酸盐钠提高肌动蛋白溶液的 pH 至 9.0。
8. 以 5∶1 的克分子质量把荧光素溶液加入肌动蛋白溶液中。在烧杯中放入玻棒，用铝箔盖严烧杯口，室温搅拌 45min。

9. 45min 后，第二次加入分装的荧光素溶液，和第一次加的量相等。室温下，重新盖严烧杯，继续搅拌 45min。冷却超速离心机和转子到 4℃。
10. 标记后，加入 1mol/L NH_4Cl 至终浓度为 50 mmol/L 以终止反应。4℃，搅拌 10min。
11. 把溶液转移到 50ml 的超速离心管中，4℃，12 000 *g* 离心 10min，沉淀大的聚集物。
12. 收集上清至新的 50ml 带螺帽超速离心管中，0.01g 范围内平衡离心管，4℃，185 000 *g*，超速离心 F 肌动蛋白 60min。
13. 注意超速离心管中细胞沉淀的位置，吸取上清，用 5ml 的 G 缓冲液重新悬浮细胞沉淀。
14. 收集悬浮细胞沉淀到 7ml 的杜恩斯匀浆器中，在冰上缓慢匀浆再次悬浮，注意不要产生气泡，然后再加入 1ml G 缓冲液彻底冲洗超速离心管。
15. 把重新悬浮的细胞沉淀转移到预先处理过的透析管中（夹住一端以形成袋子），用 G 缓冲液洗涤透析袋。挤出泡沫用夹子夹住另外一头。把透析袋放入 1L 的量筒中，量筒里盛有 1L G 缓冲液和一个磁性搅拌棒。用铝箔把量筒盖严，在冷冻室中搅拌 3 天。每天换一次缓冲液。
16. 收集透析出的肌动蛋白，把它转移到 13.5ml 的超速离心管中，4℃，185 000 *g*，超速离心 1h，纯化肌动蛋白溶液。
17. 收集含有 G 肌动蛋白的上清到一个小烧杯里，弃掉沉淀。
18. 加入 1mol/L KCl（终浓度为 0.1mol/L），1mol/L $MgCl_2$（终浓度为 2mmol/L），100 mmol/L ATP（终浓度为 1mmol/L）4℃混合 60min，使 G 肌动蛋白和 F 肌动蛋白聚合到一起。
19. 4℃，转移溶液到一个超速离心管中，185000 *g* 超速离心 60min，收集 F 肌动蛋白。
20. 吸取上清，在杜恩斯匀浆器中用 1～2ml 预冷的 G 缓冲液重新悬浮沉淀。转移到透析袋中。
21. 在用铝箔盖着的量筒中透析重新悬浮的沉淀，量筒中盛有 1L G 缓冲液，4℃，透析 3 天，每天换含有新鲜 ATP 的缓冲液。
22. 透析后，把透析液转移入一个 13.5ml 的超速离心管中，4℃，185 000 *g*，超速离心 1h 以纯化 G 肌动蛋白。
23. 收集上清液，除了使用肌动蛋白单体的 ε_{290}（0.62 mol/L/cm）和其 45kDa 的分子质量，以及厂商提供的荧光素的 ε 值之外，还应确定溶液的浓度、总蛋白的量、产量百分比以及终产物中荧光素与肌动蛋白的结合率（支持方案 1，步骤 33）。
24. 用 0.6ml 的防紫外线显微离心管中分装冷冻的标记肌动蛋白，每支 10μl，−80℃保存。
25. 用于显微注射时，迅速解冻一个分装的标记肌动蛋白，立即转移到冰上。用预冷的 IB 把标记的肌动蛋白稀释到 0.5mg/ml，滴注冷冻，3μl 分装保存，可以使用 2 周。

参考文献：Inoue and Spring，1997；Pardee and Saudich，1982；Waterman-Storer et al. 1998，1999

撰稿人：Clare Waterman-Storer

（刘书漫　张钦宪 译）

单元 5.10 作为活细胞影像工具的 GFP

水母（*Aequorea victoria*）绿色荧光蛋白（GFP）已经成为研究细胞和发育生物学很有价值的一种工具。紧凑的桶状结构和 3-缩氨酸发色团是形成功能荧光蛋白所必需的，但是它具有很强的延展性，可发生氨基酸替代。因此，发色团内部或周围随机和直接突变会改变激发和发射光谱，并产生较亮的分子。WtGFP 的吸收峰为 397nm 和 475nm。504 nm 是另外一个绿色的激发峰值。65 位丝氨酸的替代使 WtGFP 的主要和次要吸收峰变成了一个单一的 489nm 的峰，但仍为绿色荧光。这类分子的普遍形态 EGFP，即加强的 GFP 通常还有其他氨基酸替代和密码子置换，可在哺乳动物细胞高效表达。T203Y 以及 S65G 突变可使吸收和发射波峰发生红向移动，产生黄色荧光蛋白（EYFP）。发色团内 Y66 若被组氨酸或色氨酸取代，可使吸收和发射峰值发生蓝向移动，分别产生蓝色和蓝绿色荧光蛋白（EBFP 和 ECPF）。

水母突变体的光谱未发生红移，没有超出黄色蛋白的范围，但是其他海洋生物的荧光蛋白延伸到了红色荧光区。例如，从异辐海葵（*Hetractis crispa*）提出的 HcRed 蛋白和从珊瑚（*Discosoma*）克隆出的 DsRed 蛋白。随着缓慢的繁殖这些蛋白质首先疲软，然后在低浓度下发生自我交结，但是氨基酸的替代可以减少繁殖的次数，并破坏四聚体产生二聚体甚至单体。

紧凑的桶状结构和内在的发色团是水母和珊瑚突变体的特征性结构。这些结构可以保护细胞的环境免受发色团光化裂解产物的影响，也可以保护发色团免受荧光衰竭因素的影响。在成像时通常遇到的两个此类因素是光漂白和 pH 过高或过低。荧光团的光漂白（激发导致的破坏）目前了解较少，但却是荧光成像的限制因素。荧光光漂白现象有时通过光漂白量子场和时间常数来描述，但对于细胞生物学者，和其他的荧光素相比更常见，也更实用。例如，EBFP 比 ECFP 容易发生光漂白，而 ECFP 比 EGFP 或者 EYFP更易发生光漂白。据报道，DsRed 或 mRFP1 比 EGFP 更易发生光漂白。

荧光蛋白在 pKa 值在 4.5～8.0 之间时对 pH 比较敏感。然而，许多突变体，如黄色荧光蛋白，选择性变异可使这种 pH 敏感性降至中等水平。

作为一种独特的、遗传密码编码的荧光素标记，GFP 或其他荧光蛋白在活细胞成像中的应用非常广泛。作为一种成像标记，他们的用途包括：细胞内蛋白定位，蛋白质通过分泌、内吞途径的转运，蛋白质出核和入核，细胞内细胞器追踪以及有机体内细胞示踪。荧光蛋白被用作监测多种生化因素的敏感分子，如细胞内 pH、细胞内的钙离子以及细胞不同部位的蛋白磷酸化。除了生化参数外，遗传编码的感受器在监测基因表达和细胞内蛋白质与蛋白质的相互作用等方面，可加强活细胞的成像能力。

下面讨论的问题应该被认为是制作活细胞荧光蛋白影像的开端。具体方案和步骤因试剂、设备，甚至同一设备配置的不同而不同。

制备融合蛋白

1. GFP 融合蛋白的制备与任何带有抗原决定簇的蛋白质加入 27kDa 大小的 GFP 的过

程是相似的。荧光蛋白嵌合体通常在 N 端或 C 端加入融合结构。

2. 获取目的蛋白 N 端或 C 端结构-功能的知识将有助于避免干扰母体蛋白的功能和/或定位。而且，了解每个末端表达定位的亚细胞环境对嵌合体的设计将是有用的。例如，如果可能的话，避免把 GFP 加入到酸性蛋白水解环境中的蛋白末端（如溶酶体内腔），如果没有相关知识，最初可制备 N 端和 C 端都连接 GFP 的嵌合体。

3a. 末端插入连接子：如果 N 端和 C 端都包含决定目标蛋白功能和定位的结构域，则在它和荧光蛋白之间插入短的连接肽以减少位阻的影响。

3b. 包埋插入：也可以把荧光蛋白插入到分子的基本序列中，通常在未结构化的环形区域内。如果其他方法失败可考虑此种方法，但不能保证成功。

4. 某些情况下，把编码荧光蛋白的 cDNA 插入含有编码目标蛋白 DNA 的质粒更容易。此时，根据目标蛋白是 N 端融合还是 C 端融合，应格外注意荧光蛋白的 5′端和 3′端。

5. 如果产生的是 N 端融合（指 GFP 连接到目标蛋白的 N 端），则必须合理设计 GFP 编码区域的两个末端。把 Kozak 序列和 GFP 翻译起始密码子结合起来将会保证 mRNA的高效翻译，同时应该删除 GFP 的终止密码子或者将其转化成编码氨基酸。

6. 如果产生的是 C 端的融合，则删除目标蛋白的终止密码，或者将其转化为一个编码氨基酸；保存 GFP 的终止密码子。

7. 另外也可以把编码目标蛋白的 cDNA 插入到含有编码荧光蛋白 DNA 的质粒中。在很多情况下，这种方法更简单，因为许多可以表达荧光蛋白的质粒可以买到。这些质粒通常包含一个巨细胞病毒（CMV）连接的早期启动子（在哺乳动物细胞内高效表达），一个包含了许多独特的限制性核酸内切酶识别位点的多克隆位点（MCS）（促进嵌合体的产生），一个可使质粒在细菌种选择性扩增的具抗生素抗性的区域，通常包括 G418 筛选基因。与上面所描述的荧光蛋白的插入一样，目标蛋白插入到这些质粒中也具有同样的限制。

8. 如果产生的是 C 端融合，则把目标蛋白的 cDNA 插入到一个荧光蛋白编码序列的 5′端含有 MCS 的质粒中。删除目标蛋白的终止密码子，或者将其转化为一个编码氨基酸，插入一个含有目标蛋白翻译密码子的 Kozak 序列。

9. 如果产生的是 N 端融合，则把目标蛋白的 cDNA 插入到一个荧光蛋白编码序列 3′端含有 MCS 的质粒中（荧光蛋白编码区的翻译起始段含有 Kozak 序列）。删除荧光蛋白终止密码子，或者将其转化为一个编码氨基酸；保存目标蛋白的终止密码子。

例 1：含有肽连接子结构的产生

这个例子是基于以前发表的用肽连接子分离荧光蛋白标记的溶酶体膜蛋白的策略。Lgp120 蛋白含有较大的腔内结构域、一个单一的可预测的跨膜结构域，以及有一个短的包含溶酶体定位信号的胞质尾。这种情况下，可以用肽连接子在 Lgp120 和荧光蛋白之间产生 C 端的融合，其将荧光标记在了细胞膜的胞质面。

1. 将下列合成的寡核苷酸以及互补链放入 PCR 仪中，使其复性，95℃加热 5min，然后以 1℃/min 的速度冷却到 4℃。

   5′-GAATTCGGCTCCACCGGCTCCACCGGCTCCACCGGCGCGGATCC-3′

（包括 *Eco*R Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ的限制性酶切位点）
2. 用 *Eco*R Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ的限制性核酸内切酶，37℃，1h 消化复性的 DNA 和 GFP 表达质粒 pEGFP-N1。
3. 在 1%琼脂糖凝胶上分离消化产物。切取目的条带回收提取 DNA。
4. 把经 *Eco*RⅠ/*Bam*HⅠ消化的肽连接子连接到经 *Eco*RⅠ/*Bam*HⅠ消化的 pEGFP-N1 上（由于另一个含 10 个氨基酸的连接子的 N 端连到 EGFP 上，包含重复的 S、T 和 G 序列；用 pEGFP-NL 表示）。
5. 使用 N 端的引物
   5′-GATCCTCGAGCGCCACCATGGCGGCCCCGGG-3′
   （包括 *Xho*Ⅰ位点）和 C 端引物
   5′GATCGAATTCCGAGATGGTGGTCTGATATAGC-3′
   （包括 *Eco*RⅠ），以 pBS-lgp120 为模板，PCR（附录 3F）扩增 lgp120。
6. 用 *Xho*Ⅰ和 *Eco*RⅠ，酶切消化 lgp120 的 PCR 产物和 pEGFP-NL，37℃，1h。
7. 1%的琼脂糖凝胶分离消化产物，切取目的条带回收提取 DNA。
8. 连接到同样消化的 pEGFP-NL 质粒上，生成 pEGFP-NL-lgp120。

例 2：GFP 结构转染细胞

转染细胞最理想的技术通常取决于细胞类型。通过磷酸钙共沉淀或者脂质体的技术，DNA 很容易转染进某些类型的细胞。然而，对于其他类型的细胞需要电穿孔甚至病毒转染。本书所描述的是基于可以买到的脂质体试剂 FuGENE6 转染方法。

1. 准备要成像的细胞：将细胞按一定密度种在 6 或者 12 孔板的盖玻片上或者分室盖玻片（如 Labtek，Mat-tek）上。
2. 如果使用的脂质体试剂要求无血清培养基，则去除含有血清的生长培养基，换成无血清的培养基以增加细胞转染的效率（FuGENE6 不需要此步骤）。
3. 在一个无菌试管中加入 100μl 无血清的生长培养基。
4. 加 3μl 的 FuGENE6 试剂，混合。
5. 加入 1μl 的 0.5μg /μl 的荧光素标记蛋白表达质粒，混合。
6. 室温孵育 20min。
7. 每 $4cm^2$ 面积的细胞加入 100μl 上述混合液。
8. 孵育直到固定，免疫染色或活细胞成像。据报道，FuGENE6 和许多其他的脂质体试剂对大部分细胞的生长和蛋白质的表达没有有害影响，然而，3～8h 后仍然需要换生长培养基。例如，假设此方法中每 $4cm^2$ 的细胞需要 1ml 生长培养基；因此，用无血清培养基制备的 100μl 脂质体-DNA 复合物会轻微稀释血清的浓度。应该注意稀释的程度。

例 3：哺乳动物细胞时延性共聚焦成像

以下的许多步骤适用于任何配置的显微镜，不过本例是关于时延性共聚焦成像的，这是一个普通的 GFP 时延性成像试验，使用的是激光扫描共聚焦显微镜。

1. 除了是在二氧化碳浓度可以控制的环境中捕获细胞影像，其他条件下成像均需要补

充不同的大气二氧化碳水平。例如，如果需要含有血清的生长培养基，加入25mmol/L HEPES，pH7.6，可以满足某种类型的细胞成像。如果可能的话，用小型仪器监测缓冲液中的细胞。

2. 用括号中的任一仪器保持成像细胞的温度（例如，完全封闭的显微镜培养箱，循环水浴温度控制器，独立控制的阶段加热器，热空气对流元件）。注意：这些温度控制元件的效率和价格按照从前到后依次递减。
3. 各种可用的荧光蛋白极大地降低了成像的硬件要求。使用标准的激发源和滤过设备能捕获很多这些蛋白质。表 5.10.1 列出了激光激发源的一些常用变量。
4. EGFP 和 EYFP，作为最常用的绿色荧光蛋白，能在一定程度上抵抗光漂白作用，但是在任何试验中都要考虑这种现象。应该尽可能地降低这些激发力，以延长荧光标记物的寿命。
5. 通常尽可能地保持蛋白质的低表达，因为很多哺乳动物表达质粒中所用的强启动子能引起荧光蛋白过表达的级联放大效应，并且荧光蛋白的桶状结构可以使其较弱［如水母（*Aequorea victoria*）突变体］或者较强［如某些珊瑚和异辐海葵（*Discosoma* and *Heteractis crispa*）突变体］地自我交联。
6. 开始实验时，应考虑到整个研究的时间进程。如果实验进程很快，成像的间隔时间应该很小或为零。在这种情况下，影像扫描和影像收集也要迅速。由于信噪比会随所收集的光子数目的平方根增加（即扫描时间越长，信噪比越好），增加帧频通常可降低信噪比。由于进程较慢的研究扫描时间更长，并且有更长的时间间隔，因此可以减少这些限制。两种情况均应考虑整个激发时间以减少光漂白效应。
7. 使用传统的荧光显微镜技术定位目的荧光细胞后，首先调节焦距、激发水平和探测器的捕获能力，在较短的时间内扫描细胞，探测器可以从感兴趣的焦平面获取足够的信号。要尽可能快地完成这些步骤，以减轻甚至在实验开始前就开始的光漂白效应。如果最早一次的成像可行，那么在以后所有的 GFP 时延性实验中，采用已经摸索出的设备参数，如扫描时间，激发水平和检波器的捕获和筛检，保持成像的一致性，或至少可以作为一个良好的起点。
8. 设置图像理想的像素大小。许多设备有可选择的范围（64 像素×64 像素～2048 像素×2048 像素）。通常，每平方微米的像素越多，影像就越清晰；然而，这些高像素的影像在同样的像素设置时间中需要更长时间的扫描，并且需要更多的储存空间。记住为了使数码影像保持空间分辨率，应该调整像素的大小到每个可分解单元≥2 个像素。可分解单元（r）取决于物镜的光圈（NA）和激发光的波长（λ）（$r=0.61\times\lambda/\mathrm{NA}$）。
9. 为每个影像设置理想的扫描时间。像前面提到的，研究进程的相对速度在一定程度上决定扫描时间。通过改变像素设置时间（每个像素收集荧光的时间）改变总的扫描时间或者平均一个像素所需要的时间（多次影像扫描后，单个像素收集的总荧光除以扫描次数）。简单地说，改变扫描时间在本例中不会引起差别。然而，如果使用平均像素，则应考虑到与画面平均（重复扫描整张影像）相对的线平均（用平均的像素重复扫描单一的像素线，进行平均）与平均画面。在活细胞中，荧光标记的蛋白质可能正在细胞中运动，而且平均画面像素经过扫描一整张影像所需要的时间在不同的时间点被收集。这样将会使荧光信号在比平常更大的范围内丢失。然而，线

平均或者改变像素设置时间，以及考虑改变扫描时间和进展速度可以降低或者消除这种丢失效应。

10. 设置影像之间的间隔时间。

11. 开始收集影像。

表 5.10.1 可选择的荧光蛋白

蛋白质	波长/nm		常用的激发激光线/nm	参考文献[a]
	λ_{em}	λ_{ex}		
wtGFP	393～400 (473～475)	504～509	405,413,488	Morise et al. ,1974,Biochem 13:2656 Wark et al. ,1980. Photochem. Photobiol. 31: 611; Chalfie et al. , 1994. Science 263:802
BFP(P4-3E)	384	448	365	Heim et al. ,1994,PNAS91:12501 Cubitt et al. ,1997. Methods Cell Biol. 58:19
CRP(W1B)	434(452)	476(505)	405,413,442,458	Heim et al. ,1994,PNAS91:12501 Cubitt et al. ,1997. Methods Cell Biol. 58:19
EGFP	488～489	507～509	488	Cubitt et al. ,1997. Methods Cell Biol. 58:19
10C(YFP)	514	527	488,514	Ormö et al. , 1996,Science 273:1392 Cubitt et al. ,1997. Methods Cell Biol. 58:19
Citrine(YFP)	516	529	488,514	Griesbeck et al. ,2001,JBC276-29188
Venus(YFP)	515	528	488,514	Nagai et al. ,2002. NatBiotech. 20:87
DrFP583(DsRed)	558	583	543,568	Matz et al. ,1999,Nat Biotech,17:969
DsRed. T1	554	586	543,568	Bevis and Glick, 2002, NatBiotech. 20:83
Dimer2 tdimer2(12)	552	579	543,568	Campbell et al. ,2002. PNAS 99:7877
mRFP1	584	607	543,568	Campbell et al. ,2002. PNAS 99:7877
HcRed	592	645	543,568	Gurskaya et al. , 2001, FEBS Lett. 507:16

a. 缩写：JBC，Juarnol of Biological Chemistry；PNAS，Proceeding of the National Acadeny of sciences U. S. A.

例 4：使用共聚焦显微镜的光漂白后的荧光修复

光漂白后荧光修复（FRAP）实验在设计方面与前面讨论的普通时延性实验相似，只是对选中的细胞区域用高水平的射线进行反复激发（光漂白）。这样可以减少 GFP 荧光并且使未被漂白的分子运动进入被监测的区域。大多数市面上可以买到的设备在它们的软件包中都有针对光漂白特征的设计。FRAP 实验做起来很简单，但是需要特殊的分析技术（Snapp et al. 2003）。

1. 与先前谈到过的普通时延性实验一样，考虑光漂白前后的成像步骤。

表 5.10.2 FRAP 中碰到的问题及解决办法

问题	可能的原因	解决方法
目的区域内光漂白减弱	样品激发能量减弱	需要重新校正光源或/和换成最佳的样本产量；激发物和中密度滤光器可以阻断大部分的激发光源
	非光漂白分子快速移动到光	增加影像捕获
	漂白区域，呈现出减弱的光漂白效应	增加光漂白的目标区域
光漂白后荧光修复不完全	部分目标蛋白不移动或者高水平辐射引起的光损害都能导致不完全的荧光修复	同一个区域第二次发生光漂白预示部分蛋白质不移动（完全恢复）或者光损害（再次不完全恢复）

2. FRAP 开始前，选择要进行光漂白的区域，大多数市面上可以买到的设备在它们的软件包中都有这个功能。在大多数情况下，这些设备都配置的有声光调制器(acousto optical tunable filter，AOTF)，该配置可快速地在低与高激发力之间转换，在扫描标本的时候，允许实质上任何形态的区域成为光漂白区。相比较而言，如果削弱激光的中密度滤光器的功能，转换到零削减档，同时伴随光学放大，激光能选择性地辐射细胞很小的一部分区域。快速的光放大增加了单位面积的辐射，缩短了光漂白周期；然而，在近来的技术中光放大的机械运动与中密度滤光器恢复到高削减档所需要的时间限制了第一张漂白后影像的捕获。这种方式通常比 AOTF 慢很多，并且限制了光漂白区域的形状，只能是正方形和长方形。
3. 选择辐射能力和用作选择性光漂白的扫描量。通常，光漂白过程应该尽量地短。在聚焦平面内单位面积能达到的最大激光能力和荧光物质的光稳定性是对快速光漂白的限制。激光能力，光线通过的视区和系统的校准将决定单位面积最大激光能力。在大部分实验中，选择最大激光能力并且多次扫描同一个区域可以减弱荧光性，对于每一种荧光物质和每一种设备应该测定最短的光漂白过程。
4. 通常在光漂白前要捕获 1～10 张影像，建立目标区域内荧光信号的基线。光漂白后捕获的影像数目取决于荧光修复的速度和范围。监控荧光修复的过程直到达到一个平台期，这预示着荧光修复的完成。FRAP 实验分析需要补偿全部细胞的荧光丢失。如果荧光恢复到了漂白前的数值，说明这个区域内的分子群是 100%运动的，并且与周围的分子不断地进行着交换。另外，如果荧光恢复不到漂白前的数值表明这个区域内的分子群是不运动的，不能自由地与周围的分子交换。表 5.10.2 列出了 FRAP 实验中可能碰到的一些问题。

参考文献：Chaffie et al.，1994；Snapp et al.，2003

撰稿人：Jennifer Lippincott-Schwartz and George H. Patterson

（刘书漫　张钦宪 译）

第6章　细胞蛋白质的特性

蛋白质是活体组织中最具多样性、多功能的成分。它们在大小、形状、电荷、稳定性、可溶性以及其他理化性质方面具有广泛的可变性。这种多样性源自它们由20种不同的氨基酸以任意数目和排列顺序所组成。多肽链折叠成特殊构象，这在很大程度上取决于氨基酸序列。蛋白质构象的无限性赋予了细胞功能的多样性。蛋白质具有诸如构成催化剂、受体、激素、膜离子通道、运动、细胞骨架成分、保护壳、参与基因表达调控、翻译、运输等生命活动功能。它们存在于每个亚细胞结构内，其中一些被分泌到细胞外空间，以调节细胞生存的环境或对其他细胞施加影响。

蛋白质结构和功能的可塑性以及在大多数细胞发育过程中所起的关键作用，已引起细胞生物学家的极大兴趣。有许多极好的方法学可鉴定纯化蛋白质的结构特征，这些方法学在许多书中已有介绍。然而，细胞生物学家常常面对如何从蛋白质混合物，诸如整个细胞、亚细胞片段、细胞提取物和部分纯化蛋白质中分辨出特定蛋白质的问题。在许多情况下，这些特定蛋白质是混合物中的微量成分。多年来，人们已掌握了如何利用蛋白质结构和功能的多样性设计出辨别复杂混合物中特定蛋白质特征的实验方法。这些方法利用包括蛋白质的理化性质如在蔗糖梯度上的超速离心沉降或凝胶过滤来分离蛋白质，通过某些蛋白质特异的酶活性或更常用的与特异抗体的反应来测定蛋白质。该类型的实验方法在本章做了重点介绍。

单元6.1介绍了几种测定结合膜蛋白（即区别于整合膜蛋白的外围膜蛋白）性质的方法。尽管大多数整合膜蛋白经疏水多肽片段与膜结合，但是一个亚单位也可通过糖基化的磷脂酰肌醇（GPI）基团固定于膜上。本单元介绍的检测通过GPI基团与膜结合的方法，是基于磷脂酰肌醇磷脂酶C（PI-PLC）水解GPI基团而设计的。通过GPI固定的蛋白质和一些跨膜蛋白质具有不被某些非离子型去垢剂如Triton X-100增溶的抗性，可能是由于这些蛋白质与质膜上的鞘糖脂和胆固醇富含域结合的缘故。这些结构域有时存在于被称为质膜穴样凹陷内部。本单元为使用如辛基配糖化合物或CHAPS等去垢剂使不溶于Triton的质膜蛋白的溶解提供实验方案，也包括穴样膜结构域的分离程序。

天然状态蛋白质的大小可根据其流体动力学参数，如沉降系数和Stokes半径来计算。许多情况下，通过这些参数可计算出天然蛋白质或蛋白质复合物的分子质量。单元6.2中详细描述了一种常用作测定蛋白质相对分子质量的方法：蔗糖梯度沉降速率分析法。该方法将蛋白质经梯度分离后洗脱成各组分，通过测定固有行为或聚丙烯酰胺凝胶电泳（单元7.1）结合免疫吸附（单元7.7）或免疫沉淀（单元8.5）来研究。

除沉淀速率分析外，另一个估计天然状态下细胞蛋白质分子质量的常用方法是体积排阻色谱法（也称凝胶过滤，单元6.3）。该种方法在洗脱过程中，蛋白质溶液（流动相）通过含有多孔颗粒的层析柱（固定相）时，较大的蛋白质不能进入颗粒内部而沿颗粒间隙最先流出柱外，而小分子蛋白质进入颗粒内部多孔网状结构，以致最后流出柱

外，从而使样品中分子大小不同的蛋白质得到分离，并可与已知分子质量的标准蛋白质的比较测定蛋白质的相对分子质量。排阻层析时，决定蛋白质洗脱速率最具特征性的参数是 Stokes 半径 R_S。根据这种参数以及由沉降速率分析得出的其他参数，可以计算出蛋白质的分子质量。

单元 6.1　膜结合蛋白质的分析

基本方案 1　碱性碳酸盐提取

某些条件下，只有整合膜蛋白与质膜结合在一起。这种方法适用于提取所有细胞质膜的膜蛋白。

材料（带√项见附录 1）

待研究细胞
√冰预冷的磷酸盐缓冲液（PBS）
100 mmol/L NaCl
冰预冷的 100 mmol/L 碳酸钠，pH 11.5
√2×SDS-PAGE 样品缓冲液
Triton X-100
N-辛基糖苷
√Tris-Cl 缓冲液，pH 7.5
NaCl
2 ml 杜恩斯（Dounce）匀浆器
离心机
26G 针头和 1ml 注射器
95℃水浴

1a. 对于贴壁细胞：取约 1×10^7 个贴壁细胞，用 20ml 冰冷的 PBS 洗涤 3 次，然后用 100 mmol/L NaCl 洗涤 1 次。
1b. 对于非贴壁细胞：取约 1×10^7 个非贴壁细胞，洗涤步骤同 1a，但在每次洗涤后进行微离心分离，4℃下，最大离心力不超过 1000 *g*，离心 2 min。
2. 将洗涤后的组织块（贴壁细胞）或（非贴壁）细胞重悬于 1ml 冰预冷的 100 mmol/L 碳酸钠（pH 11.5）溶液，2ml 杜恩斯匀浆器匀浆。匀浆液 4℃保存 30 min，然后 4℃下 150 000～200 000 *g* 离心 60 min。
3. 将上清液转移至另一试管。沉淀悬浮于 100 ml 冰预冷的 100 mmol/L 碳酸钠（pH 11.5）溶液中。
4a. SDS-PAGE 和/或免疫印迹实验：立即将颗粒和上清与等体积的 2×SDS-PAGE 样本缓冲液混合，用 26G 针反复打断颗粒样品中的染色体组 DNA，95℃水浴保温 5min。

4b. 免疫沉淀实验：样品中加入终浓度为 1%（w/v）的 Triton X-100、终浓度为 60 mmol/L的 *N*-辛基葡糖苷、终浓度为 50mmol/L 的 Tris·Cl（pH 7.5）和终浓度为 30 mmol/L 的 NaCl。样品在冰浴中保留 5 min，然后在 15 000 *g*，4℃离心 10 min，除去不溶解的碎片。进行标准的免疫沉淀反应（单元 8.5）。

备择方案 1　尿素提取

此步骤与碱性碳酸盐提取相同（见基本方案 1），只是 100mmol/L，pH 11.5 的碳酸钠溶液被 2 mol/L 尿素和 20mmol/L，pH 6.5 的 2-(*N*-吗啡) 乙烷磺酸（MES）溶液取代。适当浓度的尿素（2 mol/L），常被用于从细胞器中提取外周和可溶性蛋白质。尿素作为脱水剂可减少蛋白质与水的相互作用，因而可将这些蛋白质从膜上脱落。尿素可自发形成氰酸盐，与氨基酸上的氨基和巯基反应，造成蛋白质（酶）的不可逆失活，经埃德曼（Edman）降解后改变了在逆相高压液相层析上的停留时间。因而，溶液必须用高纯度的尿素新鲜配制，或在使用前除去离子，尿素溶液在 4℃储存时不得超过 1 周。

备择方案 2　高盐提取

高浓度盐溶液对蛋白质施加的影响取决于盐的浓度和性质。NaCl 和 KCl 最初被用于破坏外周膜蛋白和整合膜蛋白间的极性相互作用。此操作过程与碱性碳酸盐提取过程基本相同，但 100 mmol/L 碳酸盐被含有 10 mmol/L 的 Tris·Cl，pH8.0 和 0.5mol/L 的 NaCl 溶液取代。KCl 可被用来代替 NaCl。盐溶液可在室温下保存，但使用前必须冷藏。

备择方案 3　Triton X-114 相位分离

亲水性蛋白质溶于水相，而整合于膜上的蛋白质存在于去垢剂相中。

材料（带√项见附录 1）

待研究细胞

√细胞裂解液

√Tris/NaCl/EDTA 缓冲液

√TNET-OG 缓冲液

√2×SDS-PAGE 样品缓冲液

1. 在 2×10^6～5×10^6 个细胞中加入 1ml 冰预冷的细胞裂解缓冲液，4℃放置 45～60 min 裂解细胞。将细胞裂解液置于微离心管中，10 000 *g*，4℃离心 15min。
2. 收集上清至另一微离心管中，37℃保温 3 min。
3. 10 000 *g* 室温下离心 1min，将上层的水相（约占总体积的 95%）转移到另一微离心

管中。去垢剂相用于第 5 步。

4. 在上步实验的水相中加入 100μl 细胞裂解液再提取，重复步骤 2 和 3。从这步起弃去较低层的去垢剂相。
5. 加入 10 倍体积的 Tris/NaCl/EDTA 缓冲液再萃取第 3 步的去垢剂相，重复 2 和 3 步，弃去上层的水相。

6a. 第 4 步实验得到的水相可直接用于免疫沉淀实验（单元 8.5）。

6b. 第 5 步实验得到的去垢剂相中加入 TNET-OG 缓冲液稀释至 1ml，用于免疫沉淀实验。

6c. 用 SDS-PAGE 对提取的样品进行直接分析，将水（约 50μl）和去垢剂相（2.5μl）分别与 50 μl 2×SDS-PAGE 样品缓冲液混合，立即进行电泳或于－20℃或－80℃保存备用。

支持方案 1　Triton X-114 预浓缩

Triton X-114 需进行预浓缩以除去某些杂质，减少对 Triton X-114 相位分离可能产生的干扰。

实验材料

Triton X-114
Tris-盐缓冲液（TBS）：100mmol/L Tris-Cl，pH7.4（见配方）/150mmol/L NaCl
十二烷基硫酸钠（SDS）
Triton X-100

1. 称取 20g Triton X-114 加到 980ml 的 TBS 中，4℃搅拌 1 h 使其溶解，或直到溶解澄清，30℃搅拌过夜。
2. 弃去大部分上层的水相，加入新配制的 TBS。再次于 4℃溶解和 30℃孵育过夜，重复 2 次以上，收集最后一次的去污剂相（下层）作为储藏液，4℃保存至 1 周。
3. 取部分储藏液用 1% SDS 作 1∶1000 稀释，分别测定稀释液和 Triton X-100 标准液在 275 nm 的吸光度，用直接比较法计算出储藏液的浓度。

   Triton X-100 和 Triton X-114 的消光系数相等

基本方案 2　磷脂酰肌醇磷脂酶（PI-PLC）水解 GPI 结合蛋白

材料（带√项见附录 1）

待研究细胞
√Tris/NaCl/EDTA 缓冲液
√PI-PLC 孵育缓冲液
1000U/ml PI-PLC（磷脂酰肌醇磷脂酶 C；Boehringer Mannheim）

苯基琼脂糖 4B

Tris 盐缓冲液（TBS）：20 mmol/L Tris-Cl，pH8.0（见配方）/150mmol/L NaCl

12.5 mg/ml（100×）脱氧胆酸钠

三氯乙酸

√2×SDS-PAGE 样品缓冲液

√1mol/L Tris-Cl，pH8.0

1%（w/v）SDS/200 mmol/L Tris-Cl，pH8.0（见 Tris-HCl 配制方法）

√TNET 缓冲液

Eppendorf 涡旋搅拌器

水浴锅

1. 取约 1×10^7 个细胞，按照 Triton X-114 相位分离实验（见备择方案 3）操作，作如下变更：
   a. 在备择方案 3 的第 2 步，样品在 37℃保温 3 min，换为保温 20 min。
   b. 在备择方案 3 的第 5 步，萃取样品 2 次，换成新配制的 Tris/NaCl/EDTA 缓冲液反复抽提样品 2 次，保留去污剂相。
2. 用 10 倍体积的 PI-PLC 温育缓冲液稀释去污剂相，加入 PI-PLC 至 4～8U/ml，37℃下在搅拌器上连续搅拌 1 h。
3. 室温下 10 000 *g* 离心 1 min，收集上清。
4. 用 TBS 配制 50%的苯基琼脂糖 4B 溶液，每毫升上述上清中加入 200μl 的该溶液，4℃过夜以除去痕量不溶性膜蛋白，≤2000 *g*，4℃离心样品 10s，收集上清移入另一离心管。重复操作以除去疏水珠。
5. 沉淀物中加入脱氧胆酸钠至 125μg/ml 和三氯乙酸至 6%（w/v），冰浴 10min。10 000 *g*，4℃离心 4 min，弃上清。

6a. 加入等体积的 2×SDS-PAGE 样品缓冲液重悬沉淀物，再加少量（约 5μl）的 1 mol/L Tris-HCl（pH8.0）使之成为中性，用于 SDS-PAGE（单元 7.1）。

6b. 加入 100μl 的 1%（w/v）SDS/200 mmol/L Tris・Cl（pH8.0）重悬沉淀物，煮沸 5 min，用 10 倍体积的 TNET 缓冲液稀释样品，用于免疫沉淀实验（单元 8.5）。

基本方案 3　Triton X-100 对不溶性整合膜蛋白和 GPI 结合蛋白的增溶作用

有几种嵌入性膜蛋白在 4℃时对 Triton X-100 的增溶有选择性抵抗作用。

材料（带√项见附录 1）

待研究细胞

√磷酸盐缓冲液（PBS）

下述两种去垢剂溶液任选一种：

60 mmol/L 的 *N*-辛基葡糖苷。*N*-辛基葡糖苷溶解于 TBS（20mmol/L Tris・Cl，

pH8.0/150 mmol/L NaCl）或 MES 盐缓冲液（25 mmol/L MES，pH6.5/150 mmol/L NaCl）。

30 mmol/L 的 CHAPS。CHAPS 溶解于 TBS（20mmol/L Tris-Cl，pH8.0/150 mmol/L NaCl）或 MES 盐缓冲液（25 mmol/L MES，pH6.5/150 mmol/L NaCl）。

√含有 Triton X-100 的洗涤缓冲液。

1. 取 1×10^6～1×10^7 个细胞，用 PBS 洗涤 2 次（见基本方案 1，步骤 1a 和 1b），加入 1 ml的上述任一种去垢剂溶液，搅拌后 4℃保存 30 min～1 h。
2. 4℃下 15 000 *g* 离心 10 min 以除去不溶解的碎片，上清液用于标准免疫沉淀实验（单元 8.5）。用 Triton X-100 洗涤缓冲液冲洗免疫沉淀物。

参考文献：Brown and London，1997；Fujiki et al.，1982

撰稿人：T. Okamoto，R. B. Schwab，P. E. Scherer，and M. P. Lisanti

单元 6.2 蔗糖密度梯度区带沉淀法测定分子质量

蔗糖密度梯度区带离心法分离大分子物质，是根据待分离的物质在离心场中的沉降速度不同而设计的。由于大分子物质在离心场中迁移速度的差异而有各自的沉降系数，反映出它的质量、形状、密度和水合状态。因而，进行适当控制和测定其特有体积（大分子物质密度的一个测量指标），即可估计出相对分子质量，也可根据得出的 Stokes 半径（Rs）计算出分子质量。

不变性条件下分离得到多蛋白复合体或同聚体蛋白的寡聚体，沉淀分析可测定它们的分子质量。沉降法尤其适用于测定球状水溶性蛋白质的分子质量，有去污剂存在时整合膜蛋白分子质量的测定也可用该方法，此时由于受到一定限制仅可测出分子质量的近似值。重要的是，如果测定出不同种蛋白质或蛋白复合体（如细胞裂解液、组织匀浆液、细胞上清液、血清）的特有性质（如酶活性、抗体结合能力或吸光度），那么也可用这种方法分析。沉降以匀速进行时，蔗糖梯度可以抵抗分子散射和机械干扰，使大分子物质稳定沉淀。

传统的沉降实验对蛋白复合体（尤其是有去污剂存在时的整合膜蛋白）进行大致分离，仅能粗略估计分子质量，但对于球状水溶性蛋白质，用这种方法得出的分子质量与实际分子质量接近。区带沉淀主要用于蛋白质的分析，该种方法也适用于包括病毒和小分子核酸等核蛋白复合体相对分子质量的测定。

利用区带离心对样品（如细胞裂解液）进行初步分离，首先将样品通过蔗糖梯度超速离心，再对梯度液洗脱分为若干部分。因而区带离心受到不同区带内的蛋白质测定方法和蛋白质自身的沉降系数以及相对分子量计算方法的限制。要得到有意义的结果，必须设计和制定出相应的方法。此外，还要考虑分离范围和分辨率，以便测定梯度的斜率、超速离心用的试管的大小和超速离心的长短。最后，必须考虑梯度形成和分离方法的多样性，选择达到目的的最佳方法和（或）现有设备。

基本方案1　利用梯度自动形成仪制备蔗糖梯度的区带离心

材料

储备缓冲液的成分（如 HEPES、NaCl、Triton X-100、蛋白酶抑制剂、叠氮钠）
蔗糖（超纯）
100～250μl 的样品（如细胞溶解液）
Whatman 1 号滤纸或 0.2μm 滤器
折射计
与 SW41 Ti 转子相配的 14×89mm 离心管
梯度形成仪（Biocomp），托架，标记模块，安放 6 支 14×89mm 试管的试管架
带有 6in 孔径套管的 10ml 注射器
SW41 Ti 转子（Beckman）或其他同类转子
超高速离心机（Beckman LS-70M 或其他同类产品）

1. 配制用于制备蔗糖梯度液的储备缓冲液，并对其过滤消毒，去污剂储备液除外。
   用于细胞裂解物分离和免疫测定分析的常用缓冲液含有：
   0.02 mol/L HEPES，pH7.4（用 1mol/L 的储备液配制）
   0.15mol/L NaCl（用 5mol/L 的储备液配制）
   0.05%（w/v）Triton X-100（用 20%的储备液配制）
   蛋白酶抑制剂（由酶特异的抑制剂储备液配制）
   0.02%（w/v）叠氮钠（由 20%的储备液配制）
2. 用双重去离子水或蒸馏水配制 60%（w/v）的超纯蔗糖溶液，含 0.02%（w/v）叠氮钠。这些溶液至少用 Whatman1 号滤纸过滤，最好再用 0.22 μm 的滤器过滤以除去可能存在的颗粒。用折射计测定蔗糖储备液的浓度。取一滴储备液放在折射仪的窗上，读出折射率。根据折射率计算出蔗糖的真实浓度，调整蔗糖浓度，使其在 20℃时的折射率读数为 1.4418（表 6.2.1）。

表 6.2.1　标准蔗糖溶液的折射率[a]

蔗糖浓度/%	折射率	蔗糖浓度/%	折射率
0	1.3330	20	1.3639
3	1.3374	25	1.3723
5	1.3403	30	1.3811
7	1.3433	35	1.3902
10	1.3479	40	1.3997
12	1.3510	50	1.4200
15	1.3557	60	1.4418

a. 数据来源于 Lide（1997）的资料。

3. 用相应的缓冲液、蔗糖储备液、双重去离子水或蒸馏水配制 5% (w/v) 和 20% (w/v) 的蔗糖工作液。
4. 标记离心管的半容量线。将每只试管放入相应的梯度形成仪的标记模块中，在紧靠标记块的上方划线，样品管都作上标记。
5. 用移液管小心地将 5%的蔗糖工作液加到每只试管至半容量线上方约 2 mm。加液过程中不要产生任何气泡。对于 SW41 Ti 转子，每只试管加入试剂量约为 6.3 ml。
6. 用配有 6in 大孔径套管的 10 ml 注射器，将 20%的蔗糖工作液铺在每只试管的下面。这一步应小心地将套管放在试管的底部，缓慢推压注射器栓使溶液流入。注入过程中保持套管顶端接近但低于交界面，缓慢注入 20%的蔗糖工作液直至交界面与标记的半容量线吻合，小心取出套管，套上试管帽。实验中所有试管均重复该过程。有奇数试管时添加一个平衡管。
7. 利用梯度自动形成仪制备蔗糖梯度。首先，按仪器说明书将梯度仪平放在托架上。然后调整合适的时间、角度和转数。最后将离心管放入管槽中，启动离心机。离心结束时，打开试管盖，配平离心管，从顶端移出多余部分，4℃保存梯度管备用。
8. 在放入样品管前启动超速离心机，将温度降至 4℃。
9. 小心从梯度液的顶部移出和弃去与样品等体积的液体。

   分离后，终带的宽度至少应与装载样品的宽度相等。因此，样品的量应是试管容积的最小量。SW41 Ti 转子用 14mm×89 mm 离心管，为达到有效分辨效果，装载的样品量应≤250 μl，最好采用较小量（约 100 μl）。样品溶液的密度必须小于其下部蔗糖溶液的终点密度（即 5%的蔗糖溶液），以便样品停留在梯度液的上端，最好预过滤或超高速离心处理样品。必须有足够的试管用于平衡，若有奇数样品管时，准备一只平衡管，要求该试管装有相等的梯度液和等体积的样品。
10. 小心缓慢地将样品加到梯度液的上面，避免搅起顶部的蔗糖液。将所有梯度管放入转子的插孔中，小心地将转子放入超速离心机的转头上。关闭离心机真空，打开离心机门，小心将转子放入离心机舱，关闭机门，打开真空。调节离心速度和时间、加速速度（尽可能慢）和减速速度（关闭刹车）。按下启动开关开始离心。

    每次实验必须测定速度和时间。通常运行达最大速度，但较低的速度在一定时间内可提高小分子物的分辨率。离心时间要以期望得到的离心效果和分离范围而定，一般离心时间在 16～48 h。为了在较短时间内达到相似的分离效果，可选用较小的试管和分离较少的样品。
11. 确定超速离心机停止转动，关闭真空，打开舱门，取出转子。关闭离心机门和重启真空，进行下一次离心。实验完成，关闭真空前将离心机调至室温，确信离心机舱的真空已释放（可打开离心机门再关上），断开电源。
12. 小心从转子中取出样品管放在固定托盘上，洗脱前暂时 4℃储存。

备择方案 1　用简易梯度形成仪制备蔗糖梯度的区带离心

基本方案 1 中用到的 Biocomp 梯度形成仪价格昂贵，不能普及。然而，用普通聚碳酸酯混合装置自制蔗糖梯度，简便易行且不昂贵（图 6.2.1）。

添加材料（其他材料见基本方案 1）

小容量（如 15ml）梯度形成仪
微孔管
毛细玻璃管
蠕动泵或其他任意泵装置（可选用）

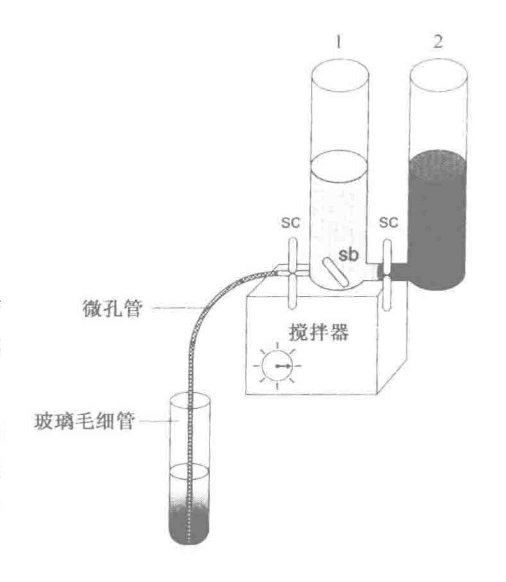


图 6.2.1 图为自制梯度形成仪装置，该装置可制备蔗糖梯度。容器 2 内有高密度（深色）溶液，容器 1 盛有低密度溶液。容器 1 中放一搅动棒（sb），该容器置于如图所示的电搅拌器上不断搅拌溶液。容器 2 和容器 1 之间、容器 1 流出口各有一活塞调节流量。微孔管和玻璃毛细管将溶液导入梯度管

1. 配制 5%和 20%的蔗糖工作液（见基本方案 1，步骤 1～3）。每种工作液的量要足够并稍有剩余，以保证实验的顺利完成。
2. 将梯度形成仪放在架子的搅拌板上，使架子与凳子上的离心管间有足够的落差。梯度形成仪水平放置（用水平仪调整）。毛细玻璃管与微孔管的远端连接。
3. 玻璃毛细管插入凳子上的离心管中，毛细管开口端置于离心管的底部。用水测量从梯度形成仪的流出量，确保流量≤0.5～1 ml/min。若流量不符合要求，通过移动梯度形成仪和离心管间的落差来调整，也可以由开关调节流量。

   尽可能避免涡流，这种现象可能由微孔管、微孔管中液体的快速流动或梯度形成过快所造成。
4. 将两个开关处于关闭位置，容器 1（流出管的起始端）中加入 6.4 ml 5%的蔗糖溶液。稍稍打开两个容器间的开关，使两个容器间的连接管充满液体，确保连接管没有气泡阻塞，再将容器 2 中积聚的溶液吸回到容器 1，但要保证连接管充满溶液。

   该技术成败的关键是气泡阻塞：连接管或流出管中的气泡减缓溶液的流动，造成涡流，阻止线性梯度的形成。
5. 容器 2 中加入 6.4 ml 的 20%蔗糖溶液，容器 1 中放入小的搅拌棒。搅拌棒所产生的速度要足以使容器 1 中的液体充分混合，又不能使溶液产生气泡或大的涡流。检查两个容器中液体的高度，通过加入相应的溶液使两个容器中的液体高度处于同一水平面。
6. 打开两个容器间的开关，容器间没有任何液体流动。小心打开流出管的开关，容器 1 中的溶液流空，梯度在离心管中就已形成。
7. 两个容器和流出管中液体流空时，梯度已完全形成。小心缓慢地从离心管中移出毛细玻璃管。如若离心管中的液体体积过高（溢出离心管）或过低（没有充满离心管），则在下一管梯度制备时调整两种溶液的体积。冲洗、干燥梯度形成仪，重复步骤 3～6 制备梯度管，直至所用离心管全部制成梯度，梯度管 4℃保存备用。
8. 装载和离心样品（见基本方案 1，步骤 10～12）。

支持方案1 普通分子质量标志物的应用和制备

分子质量标志物的最大用途是测定未知蛋白质的沉降系数和分子质量，可分为单个样品和混合样品的标志物。尽管有诸多限制，但是仍可与通过水溶性球状蛋白的比较，按下述公式推算出分子质量：$S_1/S_2=(Mr_1/Mr_2)^{2/3}$。其中 S_1 和 S_2 分别代表两种蛋白质的沉降系数，Mr_1 和 Mr_2 是这两种蛋白质的近似分子质量。表 6.2.2 提供了一些水溶性蛋白质的沉降系数和分子质量。对于一个给定的沉降实验，最好选用沉降系数在预期范围内的 2 或 3 种蛋白质作为标准。对于特殊样品，要尽量寻找分子质量在预期范围内的蛋白质作为标准。然而，这些标准不适合于计算有不同偏微比容（v）蛋白质的沉降系数。尽管如此，可溶性标准品在比较不同的沉降方式和确保梯度的重复性方面非常有用。此外，测得的相对沉降系数可用于测定一个给定蛋白质亚单位的寡聚体，而不用考虑它的构象。最后，通过与相关标准蛋白质的比较，可以估算出蛋白质的分子质量。然而，必须认识到这种分析是假设结合了去污剂的测试样品和标准品有相似的微分比容，因而有其局限性。

表 6.2.2 常用标准蛋白质的沉降系数、偏微比容和分子质量[a]

蛋白质	$S_{20,w}$/（S）	分子质量	偏微比容 v/（ml/g）
牛心细胞色素 c	1.7	12 300	0.728
溶菌酶	1.9	14 400	0.726
抹香鲸肌红蛋白	2.0	17 200	0.741
鸡卵清蛋白	3.6	42 881	0.748
牛血清白蛋白	4.6	66 000	0.734
人铁转运蛋白	4.9	77 049	0.765
人血清 IgG	7.1	155 000	0.735
兔醛缩酶	7.3	158 000	0.742
牛过氧化氢酶	11.3	247 000	0.730
大鼠 β-葡萄糖醛酸酶	12.5	288 000	0.731
马心铁蛋白	16.5	460 000	0.738
大肠干菌 β-半乳糖苷酶	15.9	540 000	0.730
甲状腺球蛋白	19.3	667 000	0.720
人血清 α-巨球蛋白	19.6	720 000	0.731

a. 数据来自国家生物技术情报中心 GenBank 序列数据库。Sober（1970），Lundh（1973），Keller and Touster（1975），Millero et al.（1976），Reisler et al.（1977），Hall and Roberts（1978），deHaen（1987）和 Buchner et al.（1991）。

添加材料（其他材料见基本方案1和备择方案1）

标准蛋白质（如 Sigma）

1. 称取选用的标准蛋白质，溶解在与制备样品相同的缓冲液中。

   蛋白质用量根据分析方法而定。开始最好用聚丙烯酰胺凝胶电泳（单元 7.1）和考马斯亮蓝染色法（单元 7.6）来鉴定标准品。这种情况下，混合物中每种标准蛋白质的用量最好约 100μg。随后用较少数目的标准蛋白质进行研究，一旦洗脱位置大体确定，就可测定蛋白质在 280nm 处的光吸收或用更少量的蛋白质测其含量。

2. 以最大转速在 4℃用微离心机离心 15 min 除去不溶解物质，弃去沉淀。
3. 分别将标准品和样品加到分离梯度上，相同条件下对标准品和样品超速离心分离（见基本方案 1，步骤 11 和 12）。洗脱后分析各组分，如 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（单元 7.1），后用考马斯亮蓝染色（单元 7.6）。

   如果试管容量有限，可以将标准品和样品与浓缩液混合在同一个试管或将标准品溶解在样品管中进行分析。虽然这种方法可以减少所用试管的数量，但也有缺陷，在标准品和样品蛋白质之间一些未知的潜在相互作用会影响到沉淀作用，需要用不同的方法分别测定标准品和样品中的蛋白质。

基本方案 2　穿刺法分部收集样品

离心管梯度区带的回收是测定超离心技术分辨率的关键步骤，即可从顶部也可从底部回收各组分，有多种仪器可供选择。每种仪器各有优缺点，但用廉价的仪器也可取得可靠的结果。

材料

待洗脱的梯度管（见基本方案 1 或备择方案 1）
部分收集器用的样品管（如 12mm×75 mm 或小离心管）
环架和试管夹
27G 针或商用穿刺器（如 Buchler）
微孔管
部分收集器（可选用）

1. 在与样品管同类型的试管中制备梯度，测试洗脱。用样品管收集梯度管的各组分。用 27G 针在离心管的底部打一孔，将针头置于试管底部，以滴为单位逐滴收集所需要的组分，测定梯度被完全洗脱时这种组分的滴数。

   离心管底部的孔要尽可能小，以便洗脱液从管底慢慢流出。收集组分的数目取决于实验的需要。分辨率越高，需要分析的组分就越多。分部收集的体积不应少于最初加到离心管上的样品体积，分离物质的最终分带体积不少于开始装载的体积。液滴的体积随着洗脱梯度和蔗糖浓度的降低而增加，这样以液滴为单位收集的分段体积有变化。如果管底的孔径恒定，这种体积变化相对较小，并在不同样品间相对稳定，但仍可影响随后的分析结果。

2. 用试管夹夹住最初收集洗脱液的试管，在适当位置固定牢。准备收集样品的试管并倒着编号，密度最小的收集管为 1 号试管，收集管正好摆放在离心管的下面。为了

便于操作，在梯度管和离心管间要留有足够的空间。

3. 用针在离心管的底部打孔，将针置于管底，分部收集从针头流出的液滴。
4. 4℃保存样品管，直至对目的样品和/或标志蛋白存在的部分进行分析。

备择方案 2 管底穿刺蠕动洗脱分离法

尽管大量的层流使区带扩展，但是蠕动洗脱技术因具有全自动、使用简便、仪器普通、速度快和相对容易安装的特点而被广泛应用。

添加材料（其他材料见基本方案 2）

待洗脱的梯度管（见基本方案 1 或备择方案 1）
模仿梯度（与样本所用梯度相同）
蠕动泵
带有收集管的部分收集器（12mm×75mm 管或 1.5ml 微量离心管）
玻璃微孔毛细吸量管
微孔管
中央有孔的离心管帽
离心管架

1. 将蠕动泵与带有微量试管的部分收集器按顺序连接起来。用与实验中所用溶液成分相同的模拟梯度测定泵速，使液体从出口以 0.5～1ml/min 的速度缓慢流出。将全部梯度洗脱入指定的编号试管中，测量所需组分的体积。准备带有适当数量试管的部分收集器，多准备些试管以防收集器出现问题。

   部分收集器必须与蠕动泵连成一体，以测定收集所需体积花费的时间。收集所需液层时最好以时间为基础而不测定液滴大小，因为液滴的大小会随蔗糖梯度的变化而变化。为收集某一特定液层，要测定所需要的泵速、时间和液滴数。首先用水然后用模拟的蔗糖梯度演练区带收集。根据分辨率要求选择试管编号和需要的相应组分。该组分不应小于加到蔗糖梯度上的样品体积。
2. 玻璃毛细吸量管与蠕动泵的微孔管的顶端连接。在梯度离心管帽的中央打一小孔。离心管帽位于管口的外面，毛细吸量管可通过该小孔进入试管。
3. 将第一个梯度样品管放在紧靠蠕动泵的架子上并牢牢固定。盖上试管帽，通过帽上的小孔缓慢放置毛细吸量管进入样品管内，小心不要搅动梯度，确保放置的毛细吸量管位于试管底部的中央，位置由试管帽支撑。
4. 同时打开蠕动泵和部分收集器，首先收集的是底部高密度层，然后是顶部的低密度层。样品管 4℃保存，用于测定各组分中的目的蛋白和/或标志蛋白。

支持方案 2 沉降系数的计算

一种未知样品的沉降系数 S 可直接从样品的分离参数和在离心场的迁移计算出来。

然而，S 值随温度和样品沉降所用介质成分的不同而变化。测定大分子物质的相对分子质量，不同的离心介质在水为 20℃ 的标准状况（$S_{20,w}$）下，沉降系数也不同。如果标准蛋白和样品蛋白性质相似，很容易通过比较它们在离心场的移动直接推算出相对的沉降系数。已知 $S_{20,w}$ 值和水溶性球状标准蛋白的实验，均可应用该方法测定样品蛋白的 S 值。如果已测定出标准品的迁移距离，那么可采取样品和标准品有相似的微分比容来推算出沉降系数。

材料

样品组分的分析结果
标准品组分的分析结果
计算器

1. 根据离心管顶部弯月面到标准品和样品间的移动距离，计算比率 R

$$R = \text{样品的移动距离}/\text{标准品的移动距离}$$

假若样品和标准品的体积相同，可用峰组分（试管编号减去 1）的量代替移动距离。

因为洗脱的组分 1 并没有移动（近似于装载到梯度上的体积），所以峰组分（试管编号减去 1）的量被采用。

2. 利用标准品的 R 值和已知的 $S_{20,w}$ 值计算样品的 $S_{20,w}$ 值。

因为生物大分子在一定时间内以线性移动的方式通过梯度，R 值也代表沉降率。因此

$$R = \text{样品的 } S_{20,w}/\text{标准品的 } S_{20,w}$$

所以

$$\text{样品的 } S_{20,w} = R \times \text{标准品的 } S_{20,w}$$

这种计算方法是假定观察到的 S 值与水在 20℃ 的标准状况下的 S 值成比例。如果沉降缓冲液的盐浓度在生理水平并接近中性，那么这种假设是合理的。

互联网资源

http://131.202.97.21

参考文献：Helenius and Simons，1975；Martin and Ames，1961；Van Holde，1975

撰稿人：Michael S. Marks

单元 6.3 体积排阻层析法（凝胶过滤）测定分子质量

体积排阻层析（SEC）是测定蛋白质分子质量的常用方法之一。凝胶过滤是体积排阻层析的一种，用水作流动相，而体积排阻层析的流动相既可以是水也可以是其他溶剂。层析用的支持物或凝胶溶胀后形成多孔颗粒，溶质分子的洗脱由于分子质量小的物质可渗入多孔颗粒的内部，受到的阻滞作用大，流程长；而较大的分子，根据体积大小而排阻在多孔颗粒的外面，所以大分子优先于小分子被洗脱出来。

设计策略

排阻层析的分离范围和选择

选择最合适的预充填柱或充填材料是层析成败的关键，因为分离时填料孔径的大小控制着溶质大小的范围。为选择柱填料，表 6.3.1 列出了不同柱填料的分离范围、孔径大小、颗粒体积和供应厂家，同时表 6.3.3 列出了可供选择的充填材料，产品说明书常列出与分子质量的对数相对应的绘图用 K_d 值。绘制的图形呈现“S”或“C”形曲线，在中间部分近似直线，适用于大多数球状蛋白质绘图。

$$K_d = a - b \log M$$

式中，a 是中轴上的截距；b 是斜率。

利用这种图可以估计分离范围（工作范围位于直线部分，在约 $0.9 > K_d > 0.1$ 之间）和作出选择。如果研究的蛋白质的大小不易估计，最好选用分离范围广的填料。填料的选择性越高分离范围受到的限制就越多。选择性高的填料更能得出溶质分子质量的精确值。

表 6.3.1 HPLC 和 FPLC 填料[a]

填料品名	珠孔直径/nm	球状蛋白质的分离范围/Da	颗粒直径/μm	大小(直径×长度,mm)	供应厂商[b]
Superdex 75 HR 10/30	6	3000～70 000	13	10×300	APB
Superdex 200 HR 10/30	13	10000～600 000	13	10×300	APB
Superose 12 HR 10/30	13	1000～300 000	10	10×300	APB
Superose 6 HR 10/30	25	5000～5 000 000	13	10×300	APB
TSK-G2000SW	12.5	5000～100 000	10	7.5×30/7.5×60	TH
TSK-G2000SW_{XL}	12.5	5000～150 000	5	7.5×30	TH
TSK-G3000SW	25	10000～500 000	10	7.5×30/7.5×60	TH
TSK-G3000SW_{XL}	25	10 000～500 000	5	7.5×30	TH
TSK-G4000SW	45	20000～7 000 000	13	7.5×30	TH
TSK-G4000SW_{XL}	45	20 000～10 000 000	8	7.5×30/7.5×60	TH
Zorbax GF-250	15	4000～400 000	4	7.6×250	HP
Zorbax GF-450	30	10 000～1 000 000	6	9.4×250	HP

a. 适用于 FPLC 的填料主要由 APB 生产，有自己的层析系统。而其他填料，如 TSK 系列，既适用于用作 FPLC 玻璃柱填料，也适用于用作 HPLC 不锈钢填料。

b. 缩写：APB，Amersham Pharmacia Biotech；HP，Hewlett Packard；TH，TosoHaas。

常规 SEC 的层析柱选择

进行常规 SEC，必须选择适当的空柱。典型柱的大小应是内径 1～1.6cm，长度为 50～100cm。附件包括填料储器，此储器可装柱一次完成。为进行精确的温度调控或在

较冷的室温下操作，层析柱的外面可套上温度调节套。然而，由于实验目的的不同，常在室温下操作，需加入适当的杀菌剂。短时间（10～15min）的体积排阻高效液相层析（SE-HPLC）不应在低温下进行。

确定峰值

洗脱时，每一蛋白峰的洗脱体积，要以标准蛋白柱的洗脱体积作为标准，即时测定，通常用紫外监视器测定 210～220nm 或 280 nm 处的光吸收值。然而，对于细胞提取液，利用部分收集器收集到的洗脱液，逐一测定各组分来确定目的蛋白的洗脱体积，这些测定包括电泳、免疫印迹法（见第 7 章）、酶活性的测定和配体结合。为便于每一组分的测定，这些组分要有足够的量，因此应将每一部分最小化，以减少估计洗脱体积时出现的误差。例如，0.05～0.2 ml 的组分洗出体积适合用 SE-HPLC 柱，将有5～10 ml 的内水体积，而对于常规柱，1 ml 的组分洗出体积，就可将洗脱体积（Ve）的误差减少到 1%，此时的内水体积约有 100ml。

基本方案 1　体积排阻-高效液相层析（SE-HPLC）

材料（带√项见附录 1）

√流动相
√总体积（V_t）标记物
√外水体积（V_o）标记物
√标准蛋白
待测蛋白质的流动相溶液
0.22μm 的过滤器（蛋白兼容型）
HPLC 系统，由注射器、泵、紫外探测仪和记录仪或积分器组成
适当分离范围的 SE-HPLC 预充填柱（见设计策略，表 6.3.1）
护柱
10～100μl 注射器
过滤器
真空泵
部分收集器

1. 制备流动相并在真空条件下用 0.22μm 的过滤器过滤，以除去灰尘、增强柱的使用寿命和排除流动相中的气体。
2. 用流动相装填 HPLC 泵和注入器。
3. 将注射器出口和护柱入口、护柱出口和主柱入口、主柱出口和监测器入口连接。
4. 调整护柱和主柱流动相的流量一致，直至选用测定波长的光吸收保持恒定。

   采用的流量依赖柱间的结合，应参考制造商推荐的数据，不要超过最大压力。常用的流量是 1 ml/min，但在 0.5ml/min 甚至 0.1 ml/min 流量时会出现假峰。
5. 用注射器分别向柱上各加入 20 μl 的外水体积（V_o）标记物、柱床体积（V_t）标记物

和一种标准蛋白溶液，从吸收峰达最大的时间测定 V_o、V_t 和洗脱体积（V_e）。重复这一过程直至所有标准蛋白的 V_e 均被测定。

6. 注射 20μl 未知分子质量的蛋白质溶液从其吸收图上测定该蛋白的洗脱体积 V_e。如果样品中含有一种以上的蛋白质，显然对这些峰进行确认，应当分别收集不同部分，逐一测定相应的活性。

   7.5mm×300 mm 长的柱子不要超过 100μl。

7. 若几天内不用，将柱子保存在适当的抗菌溶液中。
8. R_S 对 K_d 和 lg R_S 对 K_d 作图（图 6.3.1）。

   如果绘制的对数图是直线，更适用于估计未知蛋白质的分子质量。

   表 6.3.2 列出了用体积排阻高效液相层析测定分子量的一组蛋白质的 R_S 值。

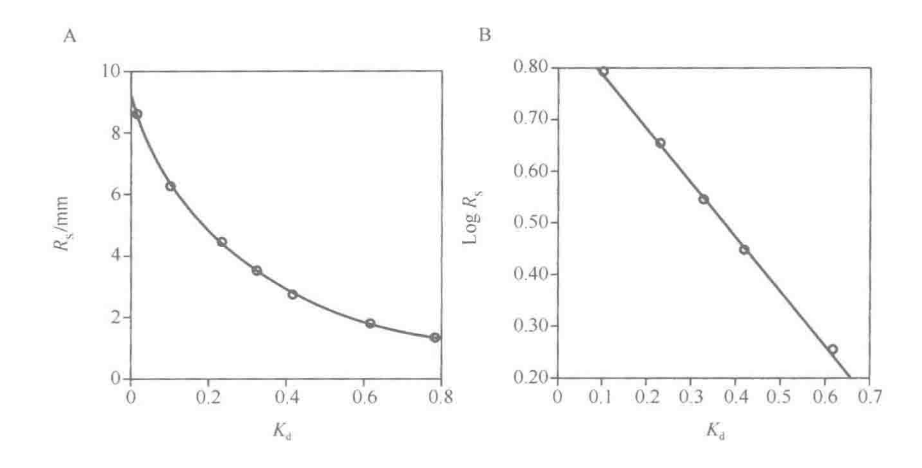


图 6.3.1 蛋白质标准曲线的绘制。标准蛋白包括甲状腺球蛋白、去铁铁蛋白、酵母醇脱氢酶、血清白蛋白、肌红蛋白和胰岛素。表 6.3.2 中除醇脱氢酶（R_S=4.55 nm）外已经给出了这些蛋白质的 R_S 值。利用上述蛋白质的 R_S 对 K_d 作图得图 A，lg R_S 对 K_d 作图得图 B。图 B 中不包括甲状腺球蛋白和胰岛素这两种蛋白质的最大和最小 K_d 值。从 6.67 ml 的蓝色葡聚糖洗脱峰测得 V_o，12.28 ml 叠氮化钠溶液洗脱峰测得 V_t

表 6.3.2 推荐的标准蛋白的 R_S 和分子质量

蛋白质	来源	分子质量/Da	R_S/nm
细胞色素 *c*	马心脏	11 700	1.7
核糖核酸酶 A	牛胰腺	13 700	1.75
肌红蛋白	马肌肉	16 950	1.9
胰蛋白酶抑制剂	大豆	22 100	2.2
β-乳球蛋白	牛奶	35 000	2.75
卵清蛋白	鸡蛋	43 000	2.8
碱性磷酸酶	大肠杆菌	86 000	3.3
血清白蛋白	牛血清	66 000	3.5

续表

蛋白质	来源	分子质量/Da	R_S/nm
运铁蛋白	人	81 000	3.6
醛缩酶	兔肌肉	158 000	4.6
过氧化氢酶	牛肝脏	220 000	5.2
天冬氨酸氨甲酰基转移酶	大肠杆菌	306 000	6.0
去铁铁蛋白	马脾脏	475 000	6.3
β-半乳糖苷酶	大肠杆菌	465 000	6.9
甲状腺球蛋白	牛甲状腺	669 000	8.6

资料来自 Le Maire et al.（1986，1987）。

基本方案 2 常规体积排阻层析（SEC）

材料（带√项见附录 1）

√常规体积排阻层析用的流动相

凝胶过滤介质（表 6.3.3）和相应的分离范围（见设计策略）

表 6.3.3 层析常用的填料

填料	珠孔直径/nm	球状蛋白质的分离范围/Da	颗粒直径/μm	供应厂商[a]
Sephacryl S100 HR	6.6	1000～100 000	25～75	APB
Sephacryl S200 HR	7.7	5000～250 000	25～75	APB
Sephacryl S300 HR	13	10 000～1 500 000	25～75	APB
Sephacryl S400 HR	31	20 000～8 000 000	25～75	APB
Superdex 75 prep grade		3000～70 000	24～44	APB
Superdex 200 prep grade		10 000～600 000	24～44	APB
Superpose 6 prep grade	21	5000～500 000	34	APB
Toyopearl HW-50S	12.5	500～80 000	20～40	TH
Toyopearl HW-55S	50	10 000～700 000	20～40	TH
Toyopearl HW-65S	100	40 000～5 000 000	20～40	TH

a. 缩写：APB，Amersham Pharmacia Biotech；TH，TosoHaas。

√着色标记物

√总体积（V_t）标记

√标准蛋白

待测蛋白质的流动相

0.22 μm 滤器（蛋白兼容型）

Buchner 漏斗和烧杯

真空泵

带有柱装置和填充储器的空柱
10 ml 注射器
蠕动泵
紫外监视器
记录仪或积分仪
过滤装置
部分收集器
加样器

1. 配制流动相溶液，在真空条件下用 0.22μm 滤器过滤以除去尘埃，增强柱的寿命和排出流动相中的气体。
2a. 如果是干凝胶，根据柱床体积和制造商给出的溶胀系数，称取适量的干燥凝胶，加入两倍于柱床体积的流动相溶液，用玻棒搅拌，使凝胶溶胀 24h。
2b. 如果是预先溶胀的凝胶，用 Buchner 漏斗冲洗需要量的溶胀凝胶，以除去储藏缓冲液。用两倍于柱床体积的流动相溶液取代储藏缓冲液。
3. 搅拌凝胶浆，然后静置，轻轻倒出凝胶上面的上清，加入新配制的流动相至原体积。重复上述操作直至液相清澈。调整液体体积使凝胶床约占总体积的一半。
4. 将柱子固定在稳定的支架上，并确保（用垂线）柱垂直于实验台上。假若凝胶床面超过柱体积的一半，增加填装储器以便装填一次完成。
5. 用注射器通过出液口加入数毫升流动相溶液，冲去存在于出口处的气体。关闭出液口。入液口连接器重复上述操作，并将连接器放入盛有流动相的烧杯中防止气体的进入。
6. 用流动相溶液灌满蠕动泵，调整所需要的流速，不要超过制造商推荐的速度。连接层析柱入口或装填储器。关闭蠕动泵。
7. 用涡流器轻轻混合凝胶浆。一次操作中，沿倾斜的玻棒向层析柱或储器中灌注凝胶，通过储器盖或顶部的连接器关闭层析柱。打开出液口并开启蠕动泵使流动相通过层析柱。原来的流速可能由于层析柱的回压发生改变，需重新调整。连续灌注流动相直至凝胶柱床面的高度不变。
8. 关闭蠕动泵，移去连接的填装储器，轻轻移动顶部连接器的平面到床面上。确保流动 1 h，以稳定凝胶床面高度。重新检查流速，必要时重新调整连接器平面至凝胶床面。

   因为有些凝胶制造商推荐的流速在这一阶段高于应用于填装柱的流速，所以也可应用相同的流速。填装完成后在连接器平面和凝胶床面间要保证没有空隙。因为混合时会出现气泡，尤其是加入样品时，这无疑会影响分辨率。
9. 检查层析柱，确保凝胶柱床没有缝隙或气泡，用点样器加入一定量（约是柱床体积的 1%～2%）的着色标记物，进行层析分离，从蓝色葡聚糖峰测定空白体积 V_o。

   装填完好的凝胶柱，着色标记物将出现陡峭的着色带。V_0 或任何峰的洗脱体积，需对收集到的体积准确测定，虽然利用有刻度的容器是可行的，这一步也可通过称重来实现。洗脱体积应是各组分体积的总和。

10. 装载可分量的总体积标记物测定柱床体积（V_t）。

这一步用于估计分辨率，装载样品的体积不应超过 V_t 的 0.5%～1%，否则会影响峰的宽度。小颗粒（10μm）的支持物用 V_t 的 0.5%，大颗粒（1000μm）的支持物可用 V_t 的 1%。对于大多数支持物，V_t 在柱体积的 80%～95%。

11. 装载一种标准蛋白溶液（约是胶床体积的 1%～2%），从吸收图谱上测定洗脱体积（V_e）。重复这一操作直至全部标准蛋白的 V_e 均被测定。
12. 装载未知蛋白质溶液，从吸收图中测定洗脱体积 V_e。如若样品中含有一种以上的蛋白质，不能确定洗脱峰时，要分部收集并测定每一部分的相对活性（见设计策略）。
13. 如若几天内不进行分析，将层析柱在适当的抗菌溶液中室温保存。
14. R_S 对 K_d 和 lg R_S 对 K_d 作图（见基本方案 1，步骤 8）。

参考文献：Ackers，1970；Hagel，1989；Pharmacia Biotech，1996

撰稿人：G. Brent Irvine

（崔景彬 译）

第7章　电泳与免疫印迹

高效新技术的发展是推动科技进步的主要驱动力之一。电泳技术在现代细胞生物学发展方面所起到的重要作用就是一个很好的例子。电泳和相关技术的应用对深入了解细胞结构和功能的分子基础方面做出了巨大的贡献。电泳技术所具备的高分辨率、使用方便、快速、低成本以及多功能性等优点是以往任何其他蛋白质分离技术所无法比拟的。正是由于此原因，电泳技术成为所有细胞生物学实验室不可或缺的工具之一，而早期报道蛋白质电泳基本技术的文章也是该领域被引用次数最多的文献（如 Laemmli 1970；O'Farrell 1975)。Laemmli 发展的 SDS 不连续凝胶电泳技术在报道后的 30 年内被广泛使用并被频繁引用。因此，任何细胞生物学领域的技术书籍都会辟出章节详细讲解电泳技术。

第 7 章的单元 7.1 汇集了最新的变性条件下单向聚丙烯酰胺凝胶电泳分析蛋白质的实验方法。十二烷基硫酸钠（SDS）在与一种还原剂结合并加热的情况下常被用作一种变性剂，这种类型的电泳被称为 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE)。电泳之前使蛋白质变性时应在以分子的大小（而非电荷或形状）来区分的基础上提高蛋白质分离效果和分辨率。利用一个不连续的系统（“浓缩”和“分离”胶的并置）能够使稀释的样品浓缩并且提高条带的清晰度。单元 7.1 首先概述了相关的电学知识和电泳技术，随后详细介绍了 Laemmli 方法的缓冲液和凝胶系统以及从该方法衍生的其他系统（即用 Tris-tricine 缓冲体系、高浓度的缓冲液、梯度凝胶、单一浓度凝胶和微型凝胶）进行 SDS-PAGE 电泳的方法。这一节还阐述了如何通过 SDS-PAGE 数据来计算蛋白质的表观分子质量。

另一种细胞蛋白质电泳分离的有效方法是在非变性情况下的单向电泳。在单元 7.2 中通过对该方法的两种实验方案的讲解详细地阐述了该方法的特点。单元 7.1 和 7.3 所述方法的区别在于后者所用蛋白质样品在电泳前或电泳过程中是不使用变性剂（如 SDS 或尿素）处理的。因此，蛋白质会依其固有特性，如大小、形状和电荷等进行迁移。这就使得在对蛋白质的分子质量影响最小时，可以对蛋白质低聚物状态、构象改变、电荷变异以及影响构象或电荷的翻译后修饰的情况进行分析。在多种情况下，该方法能够保持蛋白质的固有特性，可用特定的活性或结合实验对其进行检测。第一种方案是非变性聚丙烯酰胺凝胶连续电泳。这一方法在电泳槽内和凝胶中使用相同的缓冲体系，可在单一的分离凝胶上进行电泳。第二种实验方案所述的非变性聚丙烯酰胺凝胶不连续电泳是 SDS-PAGE 衍生的一种方法，即在所有溶液中去除 SDS 和还原剂，用不同浓度的丙烯酰胺和双（甲叉）丙烯酰胺制成的水平凝胶上检测蛋白质的迁移，用 Ferguson 图表计算其分子质量。

通过结合两种不同的电泳方法在垂直方向连续电泳（如双向凝胶电泳），能够在很大程度上提高电泳的分辨率。最普遍的双向凝胶电泳是通过第一向的等电聚焦管状凝胶电泳和随后的 SDS-PAGE 平板凝胶（第二向）电泳以达到分离蛋白质的目的。这两个

过程分别以电荷和分子大小为基础分离蛋白质，从而能够在单一的双向凝胶中分辨几千种蛋白质。单元 7.3 中阐述了利用双向等电聚焦/SDS-PAGE 分离蛋白质的一些方法。除此之外，这一单元还介绍了一种双向非还原/还原电泳的方法，即蛋白质在第一向非还原条件下和第二向还原的条件下进行 SDS-PAGE 的分离。这一类型双向凝胶电泳能够分析分子内含有二硫键的多种蛋白质复合物。这两类双向凝胶电泳既可作为分析，又可作为制备之用。为进一步分析或纯化蛋白质，也可用单向 IEF 平板凝胶进行蛋白质的分离（单元 7.4）。

聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质的局限性是蛋白质的分子质量要小于 300 000Da。大的蛋白质或多种蛋白质复合物的电泳分离需要使用其他的凝胶基质。琼脂糖是比较合适的基质，它普遍用于 DNA 的分离。单元 7.5 介绍了利用琼脂糖凝胶电泳分离蛋白质的方法。除了能够分离非常大的蛋白质，这些方法还能分析多聚物或聚合体。虽然这些过程也能够通过蔗糖梯度离心（单元 6.2）或凝胶过滤（单元 6.3）进行分析，但是琼脂糖凝胶电泳更便于对大量的样品进行分析。

电泳分离得到的蛋白质能够直接通过凝胶染色显色。单元 7.6 对四种基于不同原则的对凝胶中的蛋白质染色的方法进行了介绍。这些染色过程包括考马斯亮蓝染色、银染、SYPRO ruby 染色和锌染。这一节介绍了基本的实验方法并对如何选择高效的方法提供了指导。

单元 7.7 介绍了免疫印迹的实验方法（也称为 Western blotting）。在该技术中，通过单元 7.1 中所述电泳技术分离得到的蛋白质被电泳转移到一个薄膜之上（“电印迹”），该薄膜就成为聚丙烯酰胺凝胶的一个复本，随后用带有特定蛋白抗体的探针进行检测。一抗可通过和 ^{125}I 标记的二抗或蛋白质 A 一起孵育，自显影后显像（单元 7.8）。近年来，放射性碘标记抗体方法已逐渐被非放射性的酶偶联抗体如碱性磷酸酶或辣根过氧化酶（单元 4.4）方法所取代，通过酶作用于底物将其转化为有色、发光或具有荧光的物质。非放射性的方法与放射性的方法具有一样的敏感性，其更大的优势在于不需要在使用放射性时进行特别的防护。非放射性的检测是现今肉眼观察免疫印迹蛋白质的可行方法。非放射性方法的缺点是它们检测的线性范围比较狭窄，同时该方法必须要求精确的蛋白质定量，可能也是该技术存在的另一个问题。

单元 7.8 介绍了如何利用放射性自显影的方法使电泳分离的放射性标记的蛋白质和碘标记抗体或蛋白质 A 免疫印记检测到的蛋白质显像的方法。该技术利用放射源发出的射线使光学胶卷显影以达到显像的目的。在该技术中，可采取增强显示或使用发光化合物的方法提高敏感度，使放射性吸收基团发光从而形成影像。这一节介绍了几种不同放射源自显影的检测方法，以及用增强显示或使用荧光以增强信号的方法。单元 7.8 对利用光密计量学定量影像和利用磷光成像在凝胶中直接检测和定量放射性样品的方法也进行了探讨。

参考文献：Laemmli，1970；O'Farrell，1975

撰稿人：Juan S. Bonifacino

单元 7.1　蛋白质的单向 SDS 凝胶电泳

电泳可用于分离复杂的蛋白质混合物（如来源于细胞、亚细胞组分及过柱组分和免疫沉淀反应），研究蛋白质的亚单位组成以及证明蛋白质的均一性等，还能纯化蛋白质用于后续的研究工作。在聚丙烯酰胺凝胶电泳中，凝胶孔径及蛋白质的电荷、大小、形状决定了蛋白质的迁移率。

标准 Laemmli 凝胶法（见基本方案 1）适用于变性即在十二烷基硫酸钠（SDS）存在条件下的不连续凝胶电泳。此标准方法专为最大尺寸凝胶（如 14cm×14cm）设计，也可用于微型胶（如 7.3cm×8.3cm）。微型胶具有较快的分离速度，但是分辨率较低。

凝胶分离的蛋白质能通过随后的免疫印迹法（单元 7.7）、自显影或磷光成像（单元 7.8）、蛋白质染色法（单元 7.6）进行分析。

警告： 在应用任何方案前，阅读下面关于电学及电泳的章节是非常重要的。

注意： 所有涉及的方案中，所用的水均需是经 Milli-Q 纯化或具有相当级别的纯水。

电学与电泳

许多研究人员很少被告知有关电泳过程的电学参数，但是明确电泳的电压和电流的危险性及可能的致死性是非常必要的。实验中对安全的考虑必须压倒一切。在确定采取何种工作条件及如何解决电泳分离中出现的问题时，具备基本的电学知识和工作经验无疑是很重要的。例如，对于一个设定的电流（毫安），出现异常高或低的电压可能预示采取了不合适的缓冲液或是电泳槽漏电。

安全性考虑

1. 除非电源的电压调到零或已断路，不要试图拔出或插入高电压导线。切记，在任一时间只能用单手接触高电压导线，不能用双手去移动高压导线，否则手和导线之间的接触可能使致死的电流通过胸部和心脏。有些老式或自制的装置，其中的香蕉型插头可能没有足够的屏蔽保护，在手与它们接触的时候仍然与电源连接，所以要小心检查所有的导线和连接处，一旦发现有磨损或裸露，应立即更换。
2. 开始时电源要处于关闭状态，电压调为零，然后连接电泳装置：一般红色的高压导线插入电源的红色输出端，黑色导线插入黑色的输出端。接上导线后，在电压为零时接通电源，然后将电压、电流、功率调到设定值。关掉电源时程序正好相反：先将电压调为零，等待指针回零，关掉电源，最后去掉与电泳设备间的连接。

警告： 如果在关闭电源之前切断凝胶装置与电源的连接，电源内部可能会储存一定量的电荷。这些电荷会长时间存在于电器上，即使在没有电量供应的情况下也会通过接口释放电荷并可能导致电休克。

欧姆定律和电泳

了解欧姆定律的基本知识有助于认识电泳装置与电源如何连接。欧姆定律是：电压

＝电流×电阻，或 $V=IR$。在电泳中，凝胶可看作电阻（R），电源是电压（V）和电流（I）的来源。有些电源以恒流或恒压的方式输出，有一些则以恒定功率的方式输出，功率＝电压×电流，或 $VI = I^2R$。下面的讨论主要集中于恒流的方式，因为这是在垂直SDS-PAGE中最常见的方式。

大多数现代的商用设备都有颜色标记，电源的红色电极或阳极连接在电泳设备的红色接口，它可连接到下缓冲液槽的位置。电源的黑色电极或阴极连接到电泳设备的黑色接口，并可到达上缓冲液槽的位置。这种结构可用于垂直板的凝胶电泳，在电泳过程中带有负电荷的蛋白质或核酸从上缓冲液槽的阴极泳动到下缓冲液槽的阳极（阴离子系统）。

当凝胶与电源连接时，负电荷从阴极（黑色）末端向缓冲液槽的上端，经过凝胶流回阳极（红色）相连的下缓冲液槽，从而形成闭合回路。因此，带负电荷的分子，如SDS包裹的蛋白质和核酸，从与阴极相连的缓冲液槽的上端流向与阳极相连的缓冲液槽的下端。因为SDS携带负电荷，所以SDS-PAGE体系是一种阴离子系统。

有时，蛋白质在阳离子系统中分离。在这些凝胶中，因为凝胶缓冲液的pH非常低或者有阳离子去垢剂（CTAB）的存在，蛋白质带有正电荷，向负极（阴极）泳动，极性与SDS-PAGE正好相反：将红色电极从下缓冲液槽连接到电源的黑色输出端上，黑色电极从上缓冲液槽连接到红色的电源输出端。

大多数SDS-PAGE是在恒流条件下进行。在标准的SDS-PAGE Laemmli系统中，凝胶的电阻会随着电泳的进程增加。如果电流是恒定的话，电泳过程中电压会增加。如果有不止一块凝胶连接于电源的输出口，这些凝胶应以并联的方式连接。在并联电路中，流过每一个凝胶的电压相同。换句话说，如果电源的电压为100V，那么每一个凝胶上流过的电压也是100V。而总电流是流过每一个凝胶电压之和。因此，在电流恒定的条件下提高每个凝胶上的输出电流是必要的。两个相同的凝胶需要双倍的电流以达到初始状态的电压和分离时间。

许多凝胶装置也能在一个电源上连接两个输出口，这用于较老的限制输出口数量的电源。当在一个输出口上连接几个凝胶装置时，要确定各个凝胶单位之间的连接已被屏蔽。凝胶可以并联或串联（图7.1.1）。当两个或两个以上的凝胶单位串联于一个输出电源时，每块凝胶的电流是相同的。例如，如果电源显示为10mA，那么每个串联的凝胶也为10mA，而电压平均分配到每一块凝胶上。如果一个恒定10mA的凝胶上电压为100V，那么两个相同的串联凝胶将产生200V的电压，依此类推。因此，在串联的低电

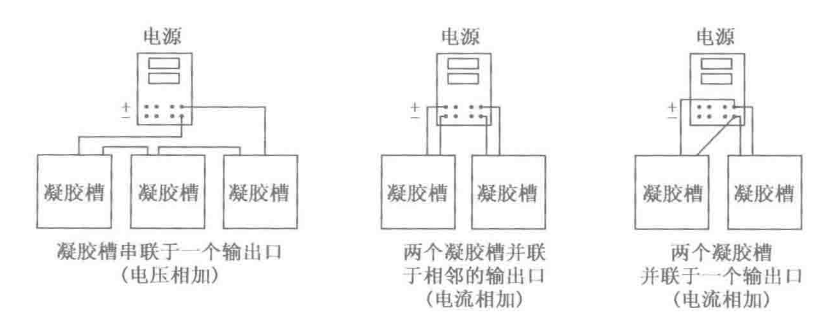


图7.1.1 凝胶槽与电源的并联和串联连接

压电路中，电压限制了所连凝胶的数量。

同时凝胶的厚度也可影响上述关系。一个 1.5mm 厚的凝胶通常被认为是两个 0.75mm 厚凝胶的并联电泳。因为在并联电路中电流是叠加的，一个 0.75mm 的凝胶需要的电流是 1.5mm 厚凝胶的一半时就能达到相同的电压和分离时间。如果凝胶厚度加倍，电流必须加倍。不过电流的输出是有限的，厚的凝胶需要更多的电流，就会产生更多的必须耗散的热量。除非电泳装置配有温度控制系统，厚凝胶的电泳一般较薄胶慢得多。

基本方案 1　变性（SDS）不连续凝胶电泳：Laemmli 凝胶法

在变性条件下（即存在 0.1% SDS）进行单向凝胶电泳，蛋白质经过聚丙烯酰胺电泳基质向阳极泳动，因为分子大小不同而得到分离。这种方案专为最大体积 0.75mm×14cm×14cm 的垂直板电泳而设计。

材料（带√项见附录 1）

分离胶和浓缩胶溶液（表 7.1.1）
水饱和的异丁醇
1×Tris · Cl/ SDS，pH 8.8（稀释自 4×Tris · Cl/ SDS，pH 8.8；表 7.1.1）
用于分析的蛋白质样品
√2×SDS 和 1×SDS 上样缓冲液
标准分子质量蛋白质混合物（表 7.1.2）
√6×SDS 上样缓冲液（可选）
√1×SDS 电泳缓冲液
电泳装置：配有夹子、玻璃板、支架、缓冲液槽的Ⅱ型可变 16cm 装置（Bio-Rad）和 SE 600/400 型 16cm 装置（Amersham Pharmacia Biotech）。
0.75mm 封边垫片
0.45μm 滤器（用于储备液的配制）
25ml Erlenmeyer 瓶
有冷阱的真空泵
带有 1、3、5、10、15 或 20 个梳齿的 0.75 mm 塑料梳子
25μl 或 100 μl 的平头注射器
恒流电源（见本章导言）

1. 依厂商的使用指南，用两块干净的玻璃平板和 0.75 mm 垫片组装电泳装置中的玻璃平板夹层，并固定在灌胶的支架上。
2. 按表 7.1.1 配制分离胶液体，通过真空管将具胶塞的 25 ml Erlenmeyer 瓶连接到有冷阱的真空泵上以除去气泡，然后加入 10%的过硫酸铵和 TEMED，轻轻搅拌混匀。

   表 7.1.1 作为简明的概要，有助于分离胶和浓缩胶的配制。浓缩胶不考虑使用已用过的分离胶。

   按所需分离的蛋白质分子大小选择合适的聚丙烯酰胺百分比浓度，通常，5%的

凝胶可用于 60～200 kDa 的 SDS 变性蛋白质分子的分离，10%用于 16～70 kDa，15%用于 12～45 kDa。

3. 用一根巴斯德吸管立即将分离胶液体沿夹层中一条垫片的边缘加入玻璃平板夹层中，至凝胶约 11cm 高为止。用另一根巴斯德吸管，先从一边的垫片，再从另一边垫片往夹层的液面顶部缓缓加入一层水饱和的异丁醇（厚约 1cm）。让凝胶在室温聚合 30～60min。

   水饱和异丁醇的制备：剧烈摇动分液漏斗中的异丁醇和水。将下层的水相去除。反复这一操作数次，上层有机相即为水饱和的异丁醇。

4. 倾去顶层的异丁醇，并以 1×Tris·Cl/ SDS，pH 8.8 缓冲液洗凝胶的顶部表面。
5. 按照表 7.1.1 配制浓缩胶液体，用巴斯德吸管缓慢地将液体沿一条垫片加入到玻璃平板夹层，避免形成气泡，直至离夹层的顶部约 1cm 高为止。
6. 将 0.75 mm 厚的 Teflon 梳子插入夹层的浓缩胶液体中，避免形成气泡。必要时，再补加浓缩胶液体充盈剩余空间。让浓缩胶在室温下聚合 30～45min。
7. 在具有螺口盖的微量离心管中，用 2×SDS 上样缓冲液按 1∶1（v/v）稀释待测蛋白质样品，于 100℃煮沸 3～5min。如样品是蛋白质沉淀物，加入 50～100 μl 1×SDS 上样缓冲液溶解，并同样在 100℃煮沸 3～5min。按供应商的使用指南用 1×SDS 上样缓冲液溶解标准分子质量蛋白质，以此为参照（表 7.1.2）。

   蛋白质稀释液可考虑使用 5∶1 的蛋白质溶液/ 6×SDS 上样缓冲液以增加蛋白质的加样量。蛋白质浓缩可用丙酮、乙醇或三氯乙酸（TCA），但是会有损失。

   对于 0.8 cm 宽的加样孔，推荐上样体积以不超过 20μl 为宜。用考马斯亮蓝染色法染色，成分很复杂的蛋白质混合物需加 25～50μg，而样品中只有一种或几种蛋白质的话，只需 1～10μg 的量。采用银染染色时，样品量可以减少至 1/100～1/10（按样品的复杂程度在小于 20μl 的体积内溶有 0.01～0.5μg 蛋白质样品不等）。

表 7.1.1 聚丙烯酰胺分离胶及浓缩胶配方[a]

分离胶

储液[b]	分离胶中丙烯酰胺的终浓度[c]/%									
	5	6	7	7.5	8	9	10	12	13	15
30%丙烯酰胺/0.8%亚甲双丙烯酰胺	2.50	3.00	3.50	3.75	4.00	4.50	5.00	6.00	6.50	7.50
4× Tris · Cl/SDS，pH 8.8	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75
H_2O	8.75	8.25	7.75	7.50	7.25	6.75	6.25	5.25	4.75	3.75
10%（w/v）过硫酸铵[d]	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
TEMED	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

分离胶的配制：

在 25 ml 烧杯中，混匀 30%丙烯酰胺/0.8%亚甲双丙烯酰胺溶液、pH 8.8 的 4×

Tris • Cl / SDS 缓冲液（见下面的试剂）和水，真空下排气泡 5min，加入过硫酸铵和 TEMED，摇匀，立即使用。

浓缩胶（3.9%丙烯酰胺）

在 25 ml 烧杯中，混匀 0.65 ml 30% 丙烯酰胺/ 0.8% 亚甲双丙烯酰胺溶液、1.25 ml pH 6.8 的 4× Tris • Cl / SDS 缓冲液（见下面的试剂部分）和 3.05 ml H_2O。真空下排气泡 10 ～15min，加入 25μl 10%过硫酸铵和 5μl TEMED，摇匀，立即使用。凝胶不能凝固表明过硫酸铵、TEMED 有问题，或二者都有问题。

凝胶中所用的试剂

30% 丙烯酰胺/0.8%亚甲双丙烯酰胺

将 30.0 g 丙烯酰胺和 0.8 g 亚甲双丙烯酰胺于 100ml H_2O 中溶解。溶液用 0.45 μm 滤膜过滤后 4℃ 避光保存。溶液储存 30 天后建议弃用，因为丙烯酰胺会逐渐降解成丙烯酸和氨水。

注意：丙烯酰胺单体具有神经毒性。称量丙烯酰胺单体时需戴面具，处理丙烯酰胺溶液时必须戴手套，不得用嘴吸取丙烯酰胺溶液。

4×Tris • Cl/SDS，pH 6.8（0.5 mol/L Tris • Cl 含 0.4% SDS）

在 40ml H_2O 中溶解 6.05g Tris 碱（0.5mol/L），用 1mol/L HCl 调校至 pH 6.8，补加 H_2O 至整体积为 100ml。再加 0.4g SDS [0.4%（m/v）]，于 4℃ 可保存 1 个月。

4×Tris • Cl/SDS，pH 8.8（1.5 mol/L Tris • Cl 含 0.4% SDS）

在 300ml H_2O 中溶解 9g Tris 碱（1.5mol/L），用 1mol/L HCl 调校至 pH 8.8，补加 H_2O 至整体积为 500ml。用 0.45 μm 滤膜过滤，再加 2g SDS [0.4%（m/v）]，于 4℃ 可保存 1 个月。

---

a. 本配方可得到 15 ml 分离胶和 5 ml 的浓缩胶，足够用于大小为 0.75 mm×14 cm×14 cm 的凝胶。本配方基于 Laemmli 建立（1970）的 SDS（变性）不连续缓冲液系统。

b. 所有的试剂和溶剂均需用 Milli-Q 级或与之相当的纯水配制。

c. 表中数字的单位为 ml，配制的分离胶百分浓度取决于待分离蛋白质的分子大小。见基本方案 1 中步骤 3 的注释。

d. 溶液最好是新鲜配制。

8. 小心拔出 Teflon 梳子，避免撕裂聚丙烯酰胺凝胶加样孔的边缘。取出梳子后，以 1×SDS 电泳电极缓冲液冲洗加样孔，并以此缓冲液充满之。
9. 按厂商指南将凝胶板固定到电泳装置的上缓冲液室（上槽），同时在下缓冲液室（下槽）中加入推荐量的 1×SDS 电泳缓冲液。将固定于上槽的凝胶板放入下槽中，并在上槽中加入部分电泳缓冲液至刚好淹没凝胶的加样孔。
10. 用带平嘴针头的 25μl 或 100μl 注射器将同样浓度的蛋白质样品等体积加到样品孔中，小心加样使样品在孔的底部成一薄层，对照孔加入标准分子质量蛋白质样品，

如有空置的加样孔，须加等体积的空白 1×SDS 上样缓冲液，以防相邻泳道样品的扩散。再往上槽加入剩余的 1×SDS 电极缓冲液，以能将上槽的铂金电极完全淹没为准。此操作需缓慢小心，以防冲起样品孔中的样品。

表 7.1.2 用于聚丙烯酰胺凝胶电泳的蛋白质标准品的分子质量[a]

蛋白质	分子质量/Da
细胞色素 c	11 700
α-乳清蛋白	14 200
溶菌酶（鸡蛋清）	14 300
肌红蛋白（抹香鲸）	16 800
β-乳球蛋白	18 400
胰蛋白酶抑制剂（大豆）	20 100
胰蛋白酶原（PMSF 处理）	24 000
碳酸酐酶（牛红细胞）	29 000
3-磷酸甘油醛脱氢酶（兔肌）	36 000
乳酸脱氢酶（猪心）	36 000
醛缩酶	40 000
卵清蛋白	45 000
过氧化氢酶	57 000
牛血清白蛋白	66 000
磷酸化酶 b（兔肌）	97 400
β-半乳糖苷酶	116 000
大肠杆菌 RNA 聚合酶	160 000
肌球蛋白重链（兔肌）	205 000

a. 蛋白质标准品有商品化试剂盒（如 Amersham Pharmacia Biotech，Life Technologies，Bio-Rad 或 Sigma）。

11. 连接电源，对于 0.75 mm 厚的垂直板电泳，先在 10 mA 恒流下电泳至溴酚蓝染料从浓缩胶进入分离胶，再将电流调至 15 mA 继续电泳至溴酚蓝到达凝胶底部为止。

    标准的 16cm 凝胶板，0.75 mm 厚的凝胶，在 4 mA 时，需电泳 15 h（过夜），15 mA 时只需电泳 4～5 h。同时电泳两块凝胶或 1.5 mm 厚的凝胶，只需电流加倍。当在 30 mA 电泳 1.5 mm 厚的凝胶，温度必须通过循环恒温水浴控制在 10～20℃，以防止电泳条带成弯曲的形状。低于 5℃不能电泳，因为 SDS 在电泳缓冲液中将会沉淀。如果上缓冲液室中的缓冲液减少了，则可能发生了泄漏的情况。
12. 关闭电源，并撤去连接的导线，弃去电极缓冲液，将凝胶夹层连同上缓冲液槽一起取出。
13. 将凝胶定位以便识别加样的顺序，将凝胶板从上槽解离出来，放在一叠吸水纸或纸巾上。小心将封边的垫片抽出一半，并以此为杠杆撬起上面的玻璃平板，使凝胶暴露出来。
14. 小心从下面的玻璃平板上移出凝胶，在凝胶的一角切去一小块以便在染色及干胶后

仍能认出加样顺序。接着就可进行蛋白质的检测，如考马斯亮蓝或银染和烘干（单元 7.6)、免疫印迹（单元 7.7）或自显影（单元 7.8）

在 5%～15%丙烯酰胺/0.2%～0.5%亚甲双丙烯酰胺凝胶的相对迁移率和分子质量的对数呈线性关系（图 7.1.2）。利用这个曲线可以通过比较已知标准蛋白分子质量确定未知蛋白质的分子质量（表 7.1.2）。

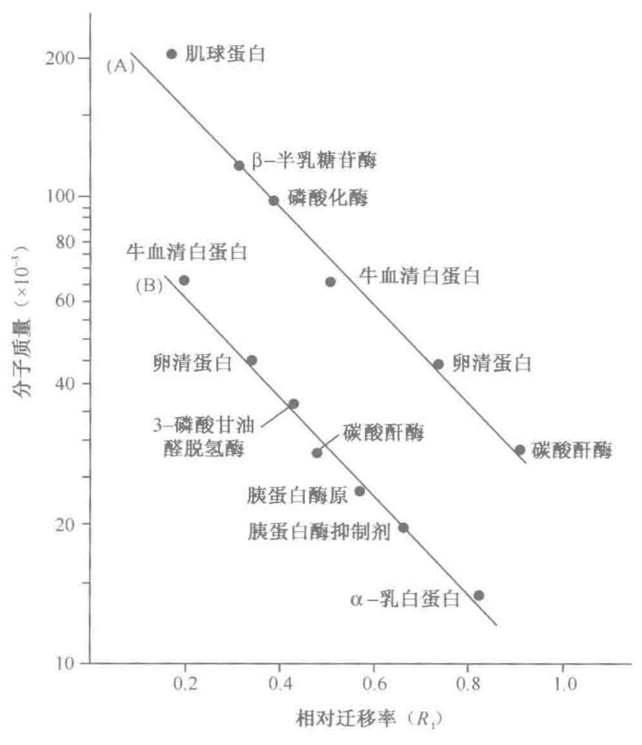


图 7.1.2　基于 Laemmli（1970）的变性（SDS）不连续凝胶电泳方法分离标准蛋白所得标准曲线图（Sigma 授权后重新绘制）

（A）7%聚丙烯酰胺凝胶；（B）11%聚丙烯酰胺凝胶

备择方案 1　Tris-tricine 缓冲液系统的电泳

在传统的 Laemmli 不连续凝胶系统中，分子质量小于 10～15 kDa 的多肽和蛋白质，会因与 SDS 共迁移而影响了分离度，得不到很好的分离效果。采用一种改进的缓冲系统 Tris-tricine 方法，可使 SDS 和多肽得到分离，从而改善了分离度。

附加材料（同见基本方案 1；带√项见附录 1）

分离胶和浓缩胶溶液（表 7.1.3）

√2×tricine（三羟基甲基甘氨酸）样品缓冲液

标准分子质量肽混合物（表 7.1.4）

√阳极缓冲液

√阴极缓冲液

√考马斯亮蓝 G-250 染液

10% (v/v) 乙酸

1. 用表 7.1.3 代替表 7.1.1 的配方，按基本方案 1 的步骤 1～6，配制溶液并灌注分离胶和浓缩胶。

表 7.1.3 Tricine 肽分离胶和浓缩胶配方[a]

分离胶和浓缩胶

储液[b]	分离胶	浓缩胶
30%丙烯酰胺/0.8%亚甲双丙烯酰胺	9.8ml	1.62ml
Tris·Cl/SDS, pH 8.45	10.00ml	3.10ml
H_2O	7.03ml	7.78ml
甘油	4.00g (3.17ml)	—
10% (w/v) 过硫酸铵[c]	50μl	25μl
TEMED	10μl	5μl

分别准备分离胶和浓缩胶

在 50 ml 的烧杯中，混合混匀 30%丙烯酰胺/0.8%亚甲双丙烯酰胺溶液（表 7.1.1）、Tris·Cl/SDS，pH 8.45（见附录 1）和水。只在分离胶中加入甘油，真空泵排气泡 10～15min。加 10%过硫酸铵或 TEMED，温和混匀立即使用。通常不能形成整齐凝胶的原因是过硫酸铵或 TEMED 有问题或是两者都有问题。

凝胶中的附加试剂

Tric-Cl / SDS，pH 8.45 (3.0mol/L Tric·Cl 含 0.3% SDS)

在 300 ml H_2O 中溶解 182 g Tris 碱（3.0mol/L），用 1mol/L HCl 调校至 pH 8.45，补加 H_2O 至整体积为 500ml。用 0.45 μm 滤膜过滤，再加 1.5g SDS，于 4℃ 可保存 1 个月。

a. 本配方可得到 30ml 分离胶和 12.5ml 的浓缩胶，足够用于制备 2 块大小为 0.75 mm×14 cm×14 cm 的凝胶。本配方基于 Schagger 和 von Jagow（1987）的 Tris·tricine 缓冲液系统。

b. 所有的试剂和溶剂均需用 Milli-Q 级或相当的纯水配制。

c. 最好是新鲜配制。

表 7.1.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳标准多肽标准品的分子质量[a]

多肽	分子质量/Da
肌球蛋白（多肽骨架）	16 950
肌球蛋白 1-131	14 440
肌球蛋白 56-153	10 600
肌球蛋白 56-131	8160
肌球蛋白 1-55	6210
胰高血糖素	3480
肌球蛋白 132-153	2510

a. 多肽标准品可以从 Sigma 公司买到。

2. 制备样品（见基本方案1，步骤7），用2×tricine上样缓冲液替代2×SDS上样缓冲液，用2×tricine上样缓冲液按1∶1（v/v）稀释待测蛋白质或多肽样品。加样前样品于40℃处理30～60min，如需降低蛋白水解活性，可在100℃处理样品3～5 min。标准分子质量多肽混合物可作为参照进行蛋白质分离（表7.1.4）。
3. 组装电源装置并加样（见基本方案1，步骤8～11）。加样孔以tricine阴极缓冲液或水加以冲洗并以之充满；在电泳装置的下缓冲液槽加入阳极缓冲液，上缓冲液槽加入阴极缓冲液。
4. 连接电源，在30 V恒压下电泳1h后，接着在150 V恒压下电泳4～5h。使用热交换装置使电泳缓冲液槽温度维持室温水平。
5. 当示踪染料到达凝胶底部时，将电压调回零并断开电源。
6. 取出凝胶（见基本方案1，步骤12～14），在考马斯亮蓝G-250染色液中染色2h，接着在10%乙酸水溶液中脱色，每隔30min换一次，直至背景干净为止（一般需换液3～5次）。需要更高检测敏感度时，推荐使用银染方法。

备择方案2　在梯度凝胶中分离蛋白质

与均一浓度的凝胶相比，聚丙烯酰胺浓度呈梯度增加的凝胶能分辨的蛋白质分子质量范围更宽，特别是小分子质量范围的蛋白质条带更为清楚。与均一凝胶不同，梯度凝胶分离蛋白质更容易描绘出分子质量为10～200kDa的线性曲线，这更有利于计算蛋白质的分子质量。

附加材料（见基本方案A1）

丙烯酰胺凝胶轻溶液和重溶液（表7.1.5和表7.1.6）

表7.1.5　梯度胶的丙烯酰胺轻溶液[a]

储液	轻溶液中丙烯酰胺的终浓度[b]/%									
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
30%丙烯酰胺/0.8%亚甲双丙烯酰胺[c]	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0
4×Tris·Cl / SDS, pH 8.8[c]	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75
H_2O	8.75	8.25	7.75	7.25	6.75	6.25	5.75	5.25	4.75	4.25
10%（w/v）过硫酸铵[d]	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05

a. 检测分子质量≥10kDa的蛋白质，推荐使用5%～20%梯度胶，当分辨范围扩展至10～200 kDa，可使用10%～20%的梯度胶。

b. 表中数字的单位是使用储液的毫升数，不需要排气泡，加入TEMED前溶液在室温放置不要超过1h。

c. 配制方法参见表7.1.1。

d. 最好是新鲜配制。

表 7.1.6　梯度胶的丙烯酰胺重溶液[a]

储液	重溶液中丙烯酰胺的终浓度[b]/%										
	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
30%丙烯酰胺/0.8%亚甲双丙烯酰胺[c]	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5	10.0
4×Tris・Cl / SDS, pH 8.8[c]	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75
H_2O	5.0	4.5	4.0	3.5	3.0	2.5	2.0	1.5	1.0	0.50	0
蔗糖/g	2.25	2.25	2.25	2.25	2.25	2.25	2.25	2.25	2.25	2.25	2.25
10%(w/v)过硫酸铵[b,d]	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05

a. 梯度胶不需要排气泡。

b. 表中数字的单位是使用储液的毫升数（蔗糖除外）。在临用前加入过硫酸铵，不加 TEMED，丙烯酰胺重溶液也会发生聚合，但较慢，加入过硫酸铵后，重溶液应置于冰浴中。

c. 配制方法参见表 7.1.1。

d. 最好是新鲜配制。

溴酚蓝（可选，用以检测工作梯度）
TEMED
梯度胶混合器（30～50 ml，Amersham Pharmacia Biotech 或 30～100 ml，Bio-Rad）
带微量移液器吸头的 Tygon 聚乙烯管
蠕动泵（可选）
Whatman 3MM 滤纸

1. 如图 7.1.3 所示，在支架台上组装好磁力搅拌器、梯度胶混合器。Tygon 聚乙烯管一端连接垂直凝胶板上方的微量移液器吸头，另一端接上梯度胶混合器的输出阀。如有必要，可在梯度胶混合器与玻璃夹层之间加一个蠕动泵。在梯度胶混合器的混合室（靠近输出端）放一小磁棒转子。
2. 按表 7.1.5 和表 7.1.6 的配方配制丙烯酰胺轻溶液和重溶液。但在使用前先不加过硫酸铵，丙烯酰胺重溶液应一直保持冰浴，以防在使用时因加入了过硫酸铵而发生聚合。在梯度胶混合器的输出阀和两液槽之间的连通阀处于关闭状态时，制作一块 0.75 mm 厚的凝胶，在储液室加入 7 ml 丙烯酰胺凝胶轻（低浓度）溶液。
3. 稍稍打开连通阀，让少量（约 200 μl）轻溶液通过阀门流入混合室。在混合室中加入 7 ml 丙烯酰胺凝胶重（高浓度）溶液。向两液室的丙烯酰胺溶液中加入特定量的过硫酸铵，且每 7 ml 溶液加入约 2.3μl TEMED，并以一次性吸管加以混匀。
4. 完全打开连通阀。打开磁力搅拌器，调整速率使混合室中液体稍起漩涡即可。
5. 慢慢调节输出阀，调流速至 2 ml/min。
6. 从夹层的顶部加入凝胶液体，将吸头对着夹层的一面使液体紧沿一片玻璃平板而下，重的液体先流入夹层，接着是逐渐越来越轻的液体。待轻溶液全部流入输出管时，要加倍注意，并调整流速以保证最后的少量液体不会很快地流入夹层以致扰乱梯度。
7. 在梯度胶的顶部加入水饱和异丁醇，让凝胶聚合 1h。

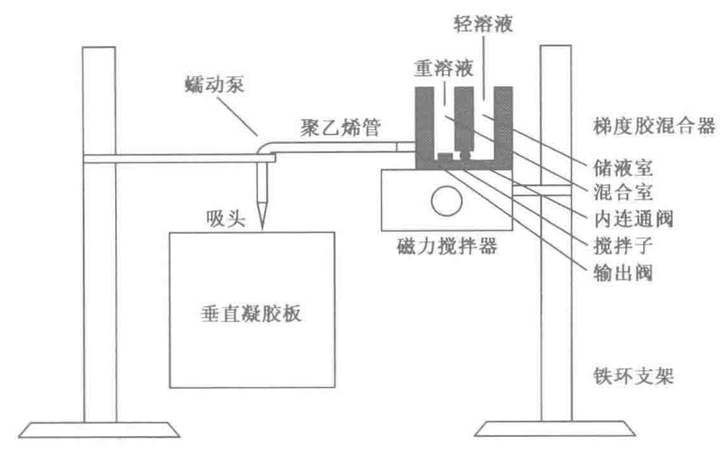


图 7.1.3 灌制梯度胶的装置

蠕动泵并非必要，但便于控制

8. 倾去水饱和异丁醇，并以 1×Tris·Cl / SDS，pH 8.8 的缓冲液冲洗。灌制浓缩胶（见基本方案 1，步骤 5）

   凝胶密封在 1×Tris·Cl / SDS，pH 8.8 缓冲液中可保存 1 周。

9. 制备待测蛋白样品和标准分子质量蛋白混合物，按基本方案 1 步骤 7～14 加样进行电泳。用考马斯亮蓝或银染方法染色（单元 7.6）。
10. 染色后，凝胶在 Whatman 3MM 或相当品质的滤纸上干燥。

参考文献：Hames and Rickwood，1990

撰稿人：Sean R. Gallagher

单元 7.2 非变性条件下的单向凝胶电泳

非变性或“天然”电泳——没有变性剂如去垢剂和尿素的电泳——是最适于检测蛋白质大小、亚基结构和进行蛋白质分离的一种技术。迁移率依蛋白质的大小、形态和内在电荷等特性而定。

基本方案 非变性聚丙烯酰胺连续电泳

通过非变性电泳分离蛋白质需要求有相同类型的变性平板凝胶电泳的装置（单元 7.1)，以及合适的凝胶尺寸的范围（从微型胶到大尺寸胶）和胶类型（单一浓度和梯度凝胶）。在一个连续的体系（用相同的缓冲液配制丙烯酰胺溶液并填满整个电泳槽）中分离蛋白质是受 pH 控制，依赖于蛋白质的等电点的。

材料（带√项见附录 1）

√4×乙酸缓冲液（200mmol/L 乙酸，pH 3.7～5.6）

√4×磷酸凝胶缓冲液（400mmol/L 磷酸钠，pH 5.8～8.0）

√4×Tris 凝胶缓冲液（200mmol/L Tris·Cl，pH 7.1～8.9）

√4×甘氨酸凝胶缓冲液（200mmol/L 甘氨酸，pH 8.6～10.6）

300mmol/L 亚硫酸钠（0.38g 溶于 10ml H_2O；用于乙酸凝胶配制）

待测蛋白样品

非变性标准蛋白

电泳缓冲液：用时将 4×凝胶缓冲液用水稀释到 1×凝胶缓冲液

75ml 烧杯（在凝胶制备中使用）

电泳装置

1. 组装凝胶电泳玻璃板夹层并固定在支架上。
2. 按照表 7.2.1、表 7.2.2、表 7.2.3 或表 7.2.4 配方配制丙烯酰胺溶液，在使用前加入过硫酸铵和 TEMED。根据蛋白质的等电点 pI、迁移率和溶解性选择缓冲液系统。避免极端的 pH 而引起变性。

表 7.2.1　乙酸非变性聚丙烯酰胺凝胶配方[a]：pH 范围 3.7～5.6[b]

储液[c]	凝胶中丙烯酰胺的终浓度[d]/%						
	5	7.5	10	12.5	15	17.5	20
30%丙烯酰胺/0.8%亚甲双丙烯酰胺	6.7	10	13.3	16.8	20	23.32	26.6
300mmol/L 亚硫酸钠[e]	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
4×乙酸凝胶缓冲液	10	10	10	10	10	10	10
H_2O	22.58	19.28	15.98	12.48	9.28	5.96	2.68
10%（w/v）过硫酸铵[e,f]	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
TEMED[f]	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02

凝胶的配制

在 75ml 烧杯中，混匀 30%丙烯酰胺/0.8%亚甲双丙烯酰胺溶液（表 7.1.1）、300mmol/L 亚硫酸钠、4×乙酸凝胶缓冲液（见试剂和溶液）和水。如果需要快速聚合，真空下排气泡 5min，加入 10%过硫酸铵和 TEMED，轻轻摇匀，立即使用。

a. 本配方可得到 40ml 凝胶溶液，足够用于一个大小为 1.5mm×14cm×16cm 或两个 0.75mm×14cm×16cm 的凝胶。

b. 在 4×乙酸凝胶缓冲液中加入未调 pH 的乙酸能够扩展 pH 范围至 2.0 左右，尽管在这一 pH 缓冲能力很小。

c. 所有的试剂和溶液均需用 Milli-Q 级或相当级别的纯水配制。

d. 表中数字的单位为 ml，适用的丙烯酰胺的百分浓度取决于待分离蛋白质的分子大小。

e. 必须新鲜配制。亚硫酸钠用来在酸性 pH 下促使有效聚合。

f. 聚合前加入。

3. 灌胶至玻璃板夹层顶部 2cm 并插入梳子。避免在梳子齿下面形成气泡。使胶在 1～

2h 聚合。

4. 用 5%（w/v）蔗糖水溶液或有可能的话用稀释的凝胶缓冲液（1～5mmol/L）溶解蛋白样品。对于高浓度的样品配成浓度为 1～2mg/ml，复杂的混合物可配成 5～10mg/ml 浓度的样品。以同样方法配制非变性标准蛋白。

表 7.2.2　磷酸非变性聚丙烯酰胺凝胶配方[a]：pH 范围 5.8～8.0

储液[b]	凝胶中丙烯酰胺的终浓度[c]/%						
	5	7.5	10	12.5	15	17.5	20
30%丙烯酰胺/0.8%亚甲双丙烯酰胺	6.7	10	13.3	16.8	20	23.32	26.6
4×磷酸凝胶缓冲液	10	10	10	10	10	10	10
H_2O	23.08	19.78	16.48	12.98	9.78	6.46	3.18
10%（w/v）过硫酸铵[d,e]	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
TEMED[e]	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02

凝胶的制备

在 75ml 烧杯中，混匀 30%丙烯酰胺/0.8%亚甲双丙烯酰胺溶液（表 7.1.1）、4×磷酸凝胶缓冲液（见配方）和水。如果需要快速聚合，真空下排气泡 5min，加入 10%过硫酸铵和 TEMED，轻轻摇匀，立即使用。

a. 本配方可得到 40ml 凝胶溶液，足够用于一个大小为 1.5mm×14cm×16cm 或两个 0.75mm×14cm×16cm 的凝胶。

b. 所有的试剂和溶液均需用 Milli-Q 级或相当的纯水配制。

c. 表中数字的单位为 ml，适用的丙烯酰胺的百分浓度取决于待分离蛋白质的分子大小。

d. 必须新鲜配制。

e. 聚合之前加。

表 7.2.3　Tris 非变性聚丙烯酰胺凝胶配方[a]：pH 范围 7.1～8.9

储液[b]	凝胶中丙烯酰胺的终浓度[c]/%						
	5	7.5	10	12.5	15	17.5	20
30%丙烯酰胺/0.8%亚甲双丙烯酰胺	6.7	10	13.3	16.8	20	23.32	26.6
4×Tris 凝胶缓冲液	10	10	10	10	10	10	10
H_2O	23.08	19.78	16.48	12.98	9.78	6.46	3.18
10%（w/v）过硫酸铵[d,e]	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
TEMED[e]	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02

凝胶的制备

在 75ml 试剂瓶中，混匀 30%丙烯酰胺/0.8%亚甲双丙烯酰胺溶液（表 7.1.1）、4×Tris 凝胶缓冲液（见配方）和水。如果需要快速聚合，真空下排气泡 5min，加入

10%过硫酸铵和 TEMED，轻轻摇匀，立即使用。

---

a. 本配方可得到 40ml 凝胶溶液，足够用于一个大小为 1.5mm×14cm×16cm 或两个 0.75mm×14cm×16cm 的凝胶。

b. 所有的试剂和溶剂均需用 Milli-Q 级或相当的纯水配制。

c. 表中数字的单位为 ml，适用的丙烯酰胺的百分浓度取决于待分离蛋白质的分子大小。

d. 必须新鲜配制。

e. 聚合之前加。

5. 小心拔出梳子，用电泳缓冲液（最好稀释 4×凝胶缓冲液为 1×凝胶缓冲液）冲洗加样孔。将胶齿中加满电泳缓冲液。如果需要可预试凝胶。

表 7.2.4　甘氨酸非变性聚丙烯酰胺凝胶配方[a]：pH 范围 8.6～10.6

储液[b]	凝胶中丙烯酰胺的终浓度[c]/%						
	5	7.5	10	12.5	15	17.5	20
30%丙烯酰胺/0.8%亚甲双丙烯酰胺	6.7	10	13.3	16.8	20	23.32	26.6
4×甘氨酸凝胶缓冲液	10	10	10	10	10	10	10
H_2O	23.08	19.78	16.48	12.98	9.78	6.46	3.18
10%（w/v）过硫酸铵[d,e]	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
TEMED[e]	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02

凝胶的制备

在 75ml 烧杯中，混匀 30%丙烯酰胺/0.8%亚甲双丙烯酰胺溶液（表 7.1.1）、4×甘氨酸凝胶缓冲液（见试剂和溶液）和水。如果需要快速聚合，真空下排气泡 5min，加入 10%过硫酸铵和 TEMED，轻轻摇匀，立即使用。

---

a. 本配方可得到 40ml 凝胶溶液，足够用于一个大小为 1.5mm×14cm×16cm 或两个 0.75mm×14cm×16cm 的凝胶。

b. 所有的试剂和溶液均需用 Milli-Q 级或相当级别的纯水配制。

c. 表中数字的单位为 ml，适用的丙烯酰胺的百分浓度取决于待分离蛋白质的分子大小。

d. 必须新鲜配制。

e. 聚合之前加。

6. 小心加入样品，0.75mm 厚的凝胶每泳道加样 10μl 或 1.5mm 厚的凝胶每泳道加 20μl，使其在加样孔中形成一个细带。用非变性标准蛋白作为对照。在剩余孔中加入等体积的电泳缓冲液以防相邻的条带扩散。

   在非变性凝胶系统中需要特殊的迁移率（R_f）标记。对于阳离子系统，细胞色素 c（pI 为 9～10，5～10μg/泳道）作为一种 R_f 标记。溴酚蓝（10μl/ml）对于阴离子系统是合适的标记。标记物要和样品一起溶在增溶缓冲液中。

7. 装好凝胶，在上下缓冲液槽中充满电泳缓冲液，连接电源。对于 1.5mm 厚的凝胶电流设为 30mA（0.75mm 厚的凝胶电流为 15mA）。

如果在分离状态下蛋白质是带负电荷的，用标准的SDS-PAGE的极性电极（蛋白质向阳极或正极移动，见单元7.1）。如果蛋白质是带正电荷的，将电极反接电源（红高电压线连接黑色输出端，黑高压线接红色输出端），也就是带正电蛋白质向阴极迁移。

8. 继续电泳直到 R_f 到达凝胶的底部，对于微型胶为1～2h，对于标准凝胶为4～6h。
9. 关掉电源，拆卸装置，从夹层中取出凝胶。按单元7.6所述方法进行凝胶染色。

备择方案　非变性不连续凝胶电泳以及分子质量标准曲线的绘制

一种简单的不连续非变性电泳方法是从标准Laemmli SDS-PAGE方法（单元7.1）中去除SDS和还原剂（DTT）。样品缓冲液中不含SDS或DTT，并且凝胶和电泳溶液的配制液不含SDS。

材料（同见基本方案；带√项见附录1）

√4×Tris·Cl，pH8.8（1.5mol/L Tris·Cl）
√4×Tris·Cl，pH6.8（0.5mol/L Tris·Cl）
待测蛋白样品
√2×Tris/甘油上样缓冲液
非变性标准蛋白（Sigma非变性标准蛋白试剂盒）
√Tris/甘油电泳缓冲液

1. 组装凝胶电泳玻璃板夹层并固定在支架上。配制并灌注凝胶，分离胶用4×Tris·Cl，pH8.8配制，浓缩胶用4×Tris·Cl，pH6.8配制，以此代替含SDS混合溶液（见表7.1.1）。配制最小量的四种不同丙烯酰胺浓度的分离胶（如5%、7.5%、10%、12%）。
2. 1∶1混合蛋白样品与Tris/甘氨酸上样缓冲液以获得1～2μg/μl的终浓度。同样配制非变性标准蛋白。拔掉梳子，冲洗加样孔，每个孔中上样10～20μl，考马斯亮蓝染色，若上样为1～2μl则用银染。
3. 安装电泳装置，用Tris/甘氨酸电泳缓冲液充满上下缓冲液槽。连接电源进行电泳。

   分离条件与不连续SDS-PAGE是相同的（30mA适用于1.5mm厚的凝胶，15mA适用于0.75mm厚的凝胶）。对于标准尺寸凝胶分离一般4～5h，对于微型凝胶需要1～2h。或者标准凝胶在4～6mA电泳过夜。
4. 标记物到达凝胶底部后，按单元7.6进行凝胶蛋白的固定及染色。测定蛋白质的相对迁移率。
5. 图中 $\log R_f$ 对应凝胶的浓度（%T）（图7.2.1）。利用线性回归计算斜率 K_r。
6. 图中 $\log K_r$ 对应log标准分子质量（图7.2.2）。用线性回归计算斜率。由给定的曲线估计标准分子和未知分子大小。

参考文献：Andrews，1986

撰稿人：Sean R. Gallagher

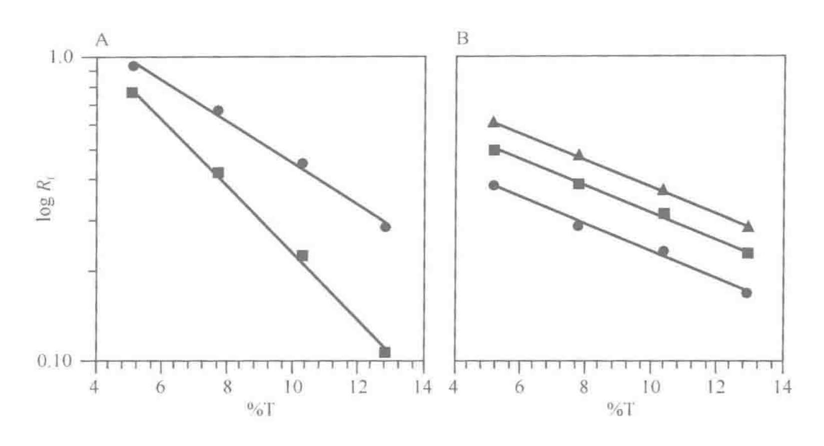


图 7.2.1 几个非变性蛋白的相对迁移率的凝胶浓度百分数

标准蛋白的相对迁移率（R_f）由四个不同的凝胶浓度决定，$\log R_f$ 对应%T 作图。

（A）BSA 单体（■）以及二聚体（●）；（B）碳酸酐酶单体

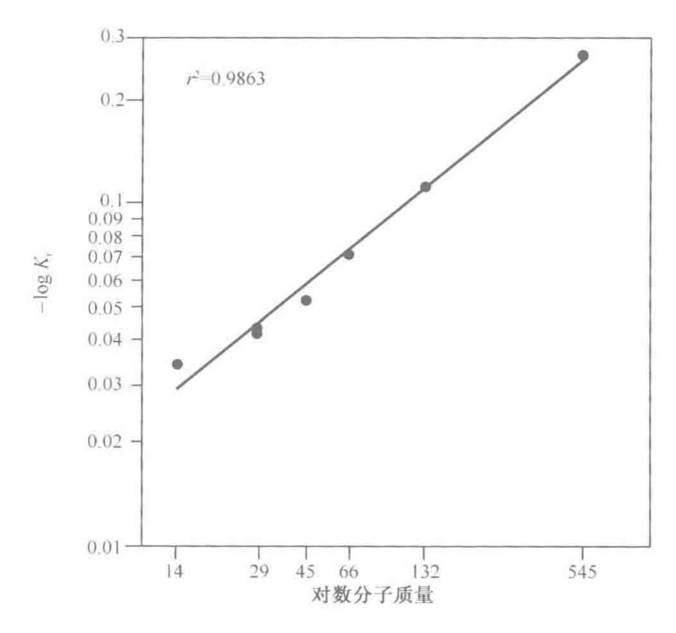


图 7.2.2 非变性蛋白分子质量标准曲线

以来自图 7.2.1 的曲线斜率（K_r）log 值对应标准分子质量的 log 值作图

单元 7.3 双向凝胶电泳

双向凝胶电泳结合了两种不同的垂直方向电泳分离技术，提供了比其他单一方法更好的复杂蛋白质复合物分离效果。尽管大型双向凝胶的总分离能力大约是每个凝胶不小于 5000 个蛋白斑点，但是在实际情况中，当利用敏感的检测方法进行复杂混合物如细

胞或组织抽提物的单一的双向分离时，能够产生 1000～2000 个适合的分离的斑点。

注意：所有溶液必须用超纯水（如 Milli-Q 纯水或相同级别的）配制。相关电学和电泳的注意事项见单元 7.1 和前言中的安全事项。

基本方案 1　高分辨率的平衡柱凝胶等电聚焦电泳

对于复合蛋白混合物如细胞抽提物，一个 3mm 的 IEF 凝胶的总蛋白承载力约为 500μg。任何单个蛋白点的最大承载量为 0.5～5μg，具体依接近其等电点蛋白质的溶解度和与邻近点的分离距离而定。

材料（带√项见附录 1）

铬酸，耐酸容器
尿素（超纯）
√30%丙烯酰胺/0.8%亚甲双丙烯酰胺
√20%（w/v）Triton X-100
两性电解质（如 pH3.0～10.0/2D；ESA）
TEMED
√2.5%（w/v）过硫酸铵（临用前配制）
√8mol/L 尿素（临用前配制）
√0.1mol/L 磷酸（H_3PO_4）
0.1mol/L NaOH（现配现用）
√溶解缓冲液
待测蛋白样品
√平衡缓冲液
2-巯基乙醇
等电聚焦装置：玻璃管，支架，凝胶柱电泳槽，橡胶扣眼，塞子
37°C 水浴
110°C 烤箱
10ml 装有滤器的注射器（滤膜 0.22μm 或 0.45μm）
10ml 平头注射器
底部用封口膜封好的凝胶灌制管（可选）
2000V 功率装置
60ml 注射器
金属或塑料药匙
干冰

1. 使用前一天将玻璃管中充满的铬酸倾去，用水冲洗管子，再用超纯水最后冲洗几次。在 110℃烤箱内干燥至少 1h，用铝箔包好放置在室温备用。

   警告：铬酸具有高腐蚀性，按照厂商使用说明小心谨慎操作。

2. 准备凝胶液：

16.9g 尿素

4.0ml 30%丙烯酰胺/0.8%亚甲双丙烯酰胺

3.0ml 20%（w/v）Triton X-100

7.5ml 水

3.0ml 两性电解液

如果有必要在37℃水浴混合直至尿素溶解

灌注凝胶

3a. 用封口膜将玻璃管一端封好并装在支架上。标记所有管以显示所需的凝胶高度。

4a. 用10ml带有针头式滤器的注射器过滤凝胶溶液。用超声波或真空泵排溶液气泡5min。然后加入42.5μl TEMED和187.5μl 2.5%（w/v）过硫酸铵溶液到滤过的凝胶混合液中混匀。

5a. 用带有平头针头的10ml注射器将凝胶溶液加入每个柱管中至所需高度。确保凝胶中没有气泡。

6a. 立即用50μl 8mol/L尿素覆盖每个凝胶管。使凝胶在用前至少聚合3h。现用现制。

利用流体静压制备凝胶

3b. 用橡皮筋将玻璃管一端捆绑成束。将管束放入底部用几层封口膜封好的凝胶灌制管，所有柱管必须是垂直的。

4b. 用带有针头式滤器的10ml注射器过滤凝胶溶液。用超声波或真空泵排溶液气泡5min，加入42.5μl TEMED和187.5μl 2.5%（w/v）过硫酸铵溶液到滤过的凝胶混合液中混匀。

5b. 吸取凝胶溶液加入到凝胶柱管和大的凝胶灌制管之间的空间。用一洗瓶轻轻地在凝胶柱管外面加水，直至将凝胶溶液压进柱管至所设定的高度。

6b. 用8mol/L尿素覆盖凝胶。使凝胶在用前至少聚合3h。

7. 将0.1mol/L H_3PO_4溶液用真空泵排气至少5min，并配制下电极缓冲液，注满底部的电泳缓冲液槽。

8. 从支架上卸下凝胶管并去除管底封口膜，检查不规则凝胶或灌有气泡的凝胶。弃去这些不合适的凝胶。如果利用流体静压灌注凝胶，去除捆绑的橡皮筋，用刀片切去多余的丙烯酰胺，然后冲洗掉残留在每个管子外面的丙烯酰胺。

9. 在每个管子顶部套上橡皮扣眼。留意在扣眼下仍可见凝胶的顶部，在扣眼上需留约5mm空间。将凝胶管连同扣眼安装在上缓冲液槽的孔眼中，多余的孔用橡皮塞堵紧。

10. 配制0.1mol/L NaOH上电极缓冲液，并用真空泵排气泡至少5min。

11. 用巴斯德吸管吸除覆盖于凝胶顶部的8mol/L尿素，并加入50μl溶解缓冲液到每个凝胶的顶部。再用0.1mol/L NaOH溶液填满凝胶管。避免NaOH与溶解缓冲液混合。

12. 灌注排气的0.1mol/L NaOH溶液到上缓冲液槽，确保所有的凝胶管都充满电极缓

冲液。仔细检查有无泄漏和气泡，然后盖上盖子。

13. 连接电源，红色（+）导线接于下槽，黑色（—）导线接于上槽。500V 恒压前聚胶 30min。
14. 关闭电源（见单元 7.1，安全考虑），撤除导线，打开盖子。用 60ml 注射器从上槽中去除电极缓冲液，弃去电极缓冲液和每个凝胶管顶部的覆盖液。小心不要损坏凝胶表面。
15. 在每个凝胶顶端加入 50μl 溶解缓冲液。放置至少 2min，再从管中弃去溶解缓冲液。
16. 上待分析的蛋白样品并小心用 50μl 溶解缓冲液的水稀释液 8∶2（v/v）覆盖每个样品。表面缓冲液与样品混合以保护上缓冲液槽中的样品。

    用等电聚焦制备相对纯度的蛋白样品通常是最直截了当的方法：在任何一种稳定的低离子浓度缓冲液中透析，或在挥发性或稳定的低离子浓度缓冲液中冻干并在溶解缓冲液中溶解，或利用三氯乙酸（TCA）沉淀蛋白质并在溶解缓冲液中重新溶解。

    蛋白质或放射性的最小样品浓度必须足够用于所用的检测方法，如组织或细胞提取物中的复杂蛋白质混合物，对于考马斯亮蓝染色或电印迹，总上样需要 500μg（单元 7.7），对于银染或免疫印迹的总蛋白上样量 50μg 已足够，对用于 ^{3}H、^{14}C 或 ^{35}S 标记的放射性自显影，每个凝胶需要不大于 100 000counts 的蛋白质样品量。对于 3mm 的凝胶加样体积要小于 150μl，而对于 1.5mm 的凝胶加样体积小于 40μl。

17. 小心用 0.1mol/L NaOH 注满整个凝胶管。避免 NaOH 溶液与样品的覆盖液混合。在上槽中充满 0.1mol/L NaOH 溶液，确保所有的凝胶管都充满了溶液。
18. 连接电源。红色（+）导线接于下槽，黑色（—）导线接于上槽。667V 恒压聚焦 18h。
19. 关闭电源小心撤去导线。打开盖子用 60ml 塑料注射器吸除上电泳缓冲液槽内的 NaOH 溶液。
20. 从槽中每次取出一个凝胶管。用 10ml 平针头注射器缓慢小心地在凝胶与玻璃管之间注入水。从管子的底部开始，然后直至凝胶管的顶部。最后凝胶会滑出玻璃管外。
21. 转移凝胶至含有 3ml 平衡缓冲液和 50μl 2-巯基乙醇的 4.5ml 的冷冻管中。盖上盖子，在室温至少孵育 5min，然后水平放置管子至干冰球上冷冻。在样品冷冻过程中不要移动或摇动管子。立即使用或储存在−80℃。

    在冷冻前短暂的孵育能够使得甘油扩散到凝胶中。孵育时间太短或在冷冻过程中摇动会导致凝胶的破损。在平衡液中总的孵育时间是至关重要的（冷冻之前和熔化之后的时间总和），应该谨慎控制。在平衡缓冲液中孵育时间不足，SDS 就没有充分的时间扩散到凝胶中并浸透到蛋白质内；过长的孵育时间会由于扩散到多孔渗水的 IEF 凝胶外导致测定蛋白质的损失。

支持方案 1　pH 特性的测定

可通过测定表面 pH 电极或在后续步骤中直接检测整个凝胶的 pH 的方法来替代分

析标准蛋白的方法，更准确地进行 pH 特性的测定

1. 制备并聚焦不含与实验样品相关的任何样品的 1 或 2 块凝胶。
2. 每个凝胶准备 20～40 个含有 1ml 排过气泡超纯水的玻璃测试管，用于测定 pH 梯度（建议测定相同的凝胶）。
3. 聚焦完成后，挤出空白胶。用水冲洗凝胶除去电极缓冲液。
4. 将凝胶放置在带有塑料标尺的玻璃板上。用锋利的刀片将凝胶切成 0.5cm 的凝胶片。将每一片放入一个盛有 1ml 水的测试管中。将所有测试管放到混匀器上室温缓慢混匀 1h。
5. 读取每个溶液的 pH 并画出 pH 特性图作为一种距离凝胶顶端距离的函数。

备择方案 1　极端酸性蛋白的非平衡等电聚焦电泳

附加材料（见基本方案 1）

10%（w/v）过硫酸铵（临用前配制）
浓硫酸（用于下电泳槽电极缓冲液中）
两性电解质，pH2.5～4.0 和 pH2.0～11.0（用于上电泳槽电极缓冲液中）
为了分析极端酸性的蛋白质，按照基本方案 1 以及以下标明步骤操作：

2. 利用下面的两性电解质混合液配制凝胶溶液：2.4ml 两性电解质 pH2.5～4.0 和 0.6ml 两性电解质 pH2.0～11.0。
4. 按照步骤灌注凝胶，再加 100μl 10%过硫酸铵混匀，加 42.5μl TEMED，再混匀。

   凝胶混合物中含有完全的或主要的极端酸性或极端碱性的两性电解质，通常非常难聚合。采用增加过硫酸铵的浓度和严格坚持加入试剂的适当顺序以确保凝胶的聚合。
7. 将 4.5ml 浓硫酸加入 3L 水中配制下层电泳槽的电极缓冲液。排气泡 5min。省略步骤 10～14（不用前聚焦）。
15. 倾去 8mol/L 尿素（聚合的覆盖液）并在每块凝胶上加入 50μl 溶解缓冲液。放置至少 2min，然后倒去溶解缓冲液。
17. 小心用 pH2.0～11.0 两性电解液与水按 1∶40 比例配制的上电泳槽电极（阳极）缓冲液注满所有的凝胶管。
18. 连接电极电源，红色导线连接下缓冲液槽，黑色导线连接上缓冲液槽，总聚焦共 4000Vh。

备择方案 2　极端碱性蛋白的非平衡等电聚焦

对极端碱性蛋白进行非平衡 IEF，可按照之前描述的步骤（见基本方案 1）以及以下标明的备选步骤操作：

7. 用 0.1mol/L NaOH 作为下电极溶液。省略 10～14 的步骤（不用前聚焦）。
15. 倾去 8mol/L 尿素（聚合的覆盖液）并在每块凝胶上加入 50μl 溶解缓冲液。放置至少 2min，然后倒去溶解缓冲液。
17. 上样后用溶解缓冲液稀释的水溶液 8∶2（v/v）覆盖（见基本方案 1），0.1mol/L H_3PO_4 代替 NaOH 填满所有的凝胶管。用 0.1mol/L H_3PO_4 作为上缓冲液槽的溶液。
18. 反接电极，即红色导线（+）连接上缓冲液槽，黑色导线（－）连接下缓冲液槽，总聚焦为 3000～5000Vh。

支持方案 2 细胞抽提物的等电聚焦

材料（带√项见附录 1）

培养有目的细胞的细胞培养瓶
√含有蛋白水解抑制剂的 PBS（PBS/I 缓冲液）
干冰/乙醇（可选，用于冷冻样品）
√Tris/SDS 缓冲液
BCA 蛋白试剂盒（Pierce）
√DNase 和 RNase 溶液
√20%（w/v）SDS
2-巯基乙醇
尿素（超纯）
√溶解缓冲液
50ml 离心管
带转子的离心机（如 Beckman JS-4.2），4℃
1～2ml 冷冻管
微型离心机，4℃
带有微型泵的超声波装置
0.2μm 微量离心滤器（如 Millipore Ultrafree-MC 滤膜）

1. 将细胞培养瓶放置于冰块上。用 2～6ml 的 PBS/I 缓冲液快速洗涤细胞 3 次。始终保持培养瓶置于冰上。
2. 加 2～6ml PBS/I 缓冲液到培养瓶中，用细胞刮刀将细胞刮落转移并悬浮于 50ml 离心管中。重复这一步骤以确保细胞完全转移。
3. 2600 *g* 4℃ 离心 15min 收集细胞。弃去上层液体用 PBS/I 缓冲液再悬浮细胞。转移细胞至标记好的冷冻管中，4℃ 最大速度离心 15min。
4. 用吸管或巴斯德吸管除去上层液体。称含有细胞的标记好的冷冻管的重量，记录细胞的湿重（mg）。干冰/乙醇混合冷冻细胞（可选）。
5. 如果样品已冷冻，将细胞从 －80℃ 中取出，每 50～100mg 湿重细胞内加入 400μl Tris/SDS 缓冲液。所有操作均在冰上进行。

6. 用带有微型泵的超声波装置，中等功率超声波破碎样品 3 次，每次 3s，间隔 5min。在操作过程中始终保持样品在冰上。
7. 进行 BCA 蛋白实验检测蛋白质浓度。为了尽可能精确，用相同量标准蛋白的 Tris/SDS 缓冲液作为实验样品。
8. 如果需要，用标记好的冷冻管储存分装样品。小管用之前要预冷。

   每部分蛋白质的量决定于预计将来要用的样品量，要避免样品的反复冻融。对于制备用 3mm 凝胶（分离蛋白序列或其他结构工作），细胞提取物的最大上样量为每块凝胶 500μg。对于银染，合适的上样量为每块凝胶 50μg。由于在蛋白质检测实验步骤后加入了试剂，最后测得的终蛋白浓度（步骤 15～20）等于蛋白质检测实验分装的蛋白质浓度除以 1.1。
9. 每 400μl Tris/SDS 缓冲液中加入 20μl DNase 和 RNase 溶液以备超声破碎细胞（步骤 6）。在冰上孵育 10min。
10. 步骤 6 中使用的 Tris/SDS 缓冲液中每 400μl 加入 20μl 20％SDS 溶液和 5μl 2-巯基乙醇。37℃孵育 5min。
11. 迅速将样品分装在准备好的小管中并立即干冰/乙醇冰浴，可于－80℃储存一年以上。
12. 如果细胞提取物已经冻结，解冻样品并迅速加入干燥的尿素至浓度为 9mol/L。

    尿素的量（mg）等于 0.83 倍样品的体积（μl）。
13. 加入等体积的溶解缓冲液，如果需要溶解尿素可以进行温育。
14. 用 0.2μm 微离心滤器以最大速度室温离心过滤样品，直到全部样品滤完。按所需体积上样到 IEF 凝胶。

    如果需要每 3mm 凝胶上 500μg 总蛋白（大多细胞提取物实际最大的上样量），在蛋白检测实验中，蛋白质浓度必须≥5μg/μl。

基本方案 2　IEF 柱凝胶的第二向电泳

材料（带√项见附录 1）

√2％（w/v）琼脂糖
√平衡缓冲液
含待测蛋白样品的等电聚焦凝胶（见基本方案 1）
一块含有标准分子质量蛋白质的琼脂糖（见支持方案 3）
斜面凝胶板
沸水浴
金属或塑料勺

1. 装配玻璃板凝胶装置和电泳设备，在凝胶装置较短的一边用一斜面凝胶板。
2. 如果第一向凝胶的厚度超过了第二向凝胶，将所需浓度的丙烯酰胺分离胶注入并立即加水覆盖以产生一个光滑的表面。分离胶的高度至少低于斜面 2cm 以能够调节浓缩胶的高度。
3. 在分离胶聚合后（凝聚的胶与水层之间有明显的分界面），倾出覆盖的水层，用水冲

洗凝胶表面后并灌入浓缩胶。浓缩胶溶液也应该加到斜面的顶端。立即用少量的水覆盖浓缩胶表面，这时由于表面张力得以黏附（图 7.3.1A）。

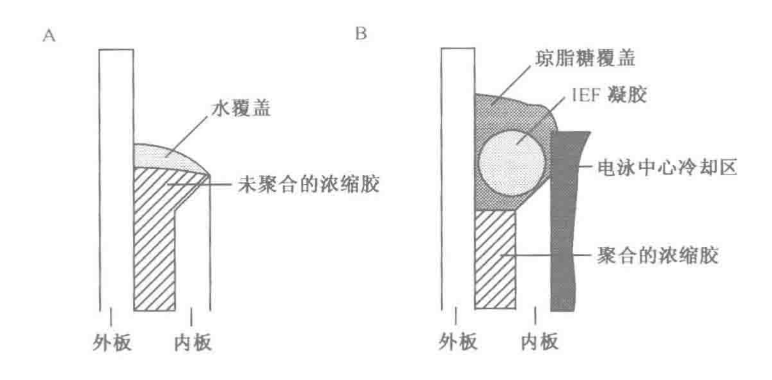


图 7.3.1 注入第二向凝胶并装填 IEF 凝胶

(A) 浓缩胶溶液应加至斜面的上边缘，然后凝胶溶液要用最少量的水层覆盖。水层之所以会黏附在表面是因为表面张力；(B) 聚合后，装配电泳的中心冷却区，平衡的 IEF 凝胶放置于聚合的浓缩胶的顶端。去除多余的缓冲液，并用热的琼脂糖/平衡缓冲液的混合液覆盖 IEF 凝胶表面。直到琼脂糖凝固，再在上缓冲液槽中注入电泳缓冲液

4. 在电泳槽内安装第二向凝胶。不要在上缓冲液槽中注入电泳缓冲液。
5. 将 2%（w/v）琼脂糖在沸水浴中融化，加入等体积的平衡缓冲液待用。使琼脂糖/平衡缓冲液维持在沸水浴中直至完成步骤 11。
6. 取出待分析含蛋白样品的等电聚焦凝胶。37°C 水浴孵育含有冰冻的 IEF 凝胶的凝胶管，对于 3mm 的柱凝胶需要孵育 15min；对于 1.5mm 或更薄的 IEF 凝胶；5～7min 就足够了。在熔化时不要摇动，因为部分熔化凝胶的剧烈摇动可能会使凝胶破裂。
7. 转移凝胶和平衡缓冲液至凝胶小瓶外的金属或塑料勺上，并用吸管小心去除多余的平衡缓冲液。
8. 在第二向凝胶上面注入几毫升电泳缓冲液。
9. 缓慢滑动 IEF 凝胶使之脱离金属或塑料勺，放置于第二向凝胶的顶部。排除凝胶之间所有的气泡。去除第二向凝胶表面多余的电泳缓冲液。
10. 邻 IEF 凝胶的一侧放置一片含有标准分子质量蛋白质的琼脂糖凝胶（见支持方案 6）（可选）。
11. 用热的琼脂糖/平衡缓冲混合液（每块胶约 2ml）小心覆盖 IEF 凝胶的表面，并使琼脂糖凝固。
12. 小心注入电泳缓冲液至上缓冲液槽，注意尽量避免碰到琼脂糖覆盖的 IEF 凝胶。连接电源进行电泳（单元 7.1）。

支持方案 3 标准分子质量蛋白质的双向凝胶

本方案提供了标准分子质量蛋白，2.5μg 适用于考马斯亮蓝染色，0.25μg 适用于银染。

材料（带√项见附录 1）

标准分子质量蛋白质（表 7.1.2）
√1×SDS 上样缓冲液
√2%（w/v）琼脂糖
沸水浴
玻璃管（内径 3mm）
塑料或金属盘

1. 用 1×SDS 上样缓冲液配制 3ml 标准分子质量蛋白质，每个标准用考马斯亮蓝 250μg 染色。与 2ml 2%（w/v）琼脂糖混合在沸水浴中使其熔化。
2. 准备一端包有封口膜的干净玻璃管。将热的混合液注入柱管中并使琼脂糖凝固。
3. 小心将凝胶从柱管中挤出来。用刀片将琼脂糖凝胶棒切成 5mm 的凝胶片。
4. 用干冰在塑料或金属盘上分别冷却凝胶切片。收集冷却的凝胶切片放入塑料瓶中，－80℃可储存一年以上。

备择方案 3　对角线凝胶电泳（非还原/还原凝胶）

备选材料（同见基本方案 2；带√项见附录 1）

分离胶和浓缩胶溶液（表 7.1.1）
√1×SDS 不含还原剂的上样缓冲液
√还原缓冲液
√1.5%（w/v）还原缓冲液配制的琼脂糖（可选，为在第二向凝胶电泳时保护第一向凝胶）
双向梳子（可选）

1. 准备干净干燥的 1.2mm 玻璃凝胶柱进行第一向凝胶（见基本方案 1）。
2. 配制所需的百分比丙烯酰胺分离胶溶液（表 7.1.1）。第一向凝胶省略浓缩胶。
3. 用带有长针头的注射器将聚丙烯酰胺凝胶注入 1.2mm 的凝胶管中。用水覆盖胶面放置，使凝胶聚合。
4. 用不含任何还原剂（不含 2-巯基乙醇或 DTT）的 1×SDS 上样缓冲液配制蛋白样品。上样后开始电泳，直至示踪染料距离柱底部约 1cm。
5. 从柱中挤压出凝胶，并将凝胶放入含有 5ml 还原缓冲液的测试管中。在 37℃缓慢搅动平衡 15min。
6. 灌注第二向分离胶和浓缩胶，确保浓缩胶顶部至少低于短玻璃板 5mm。水层覆盖整个浓缩胶或用一个双向梳子。
7. 将第一向凝胶放置在第二向凝胶上。排除两向凝胶之间的气泡。
8. 小心注入电泳缓冲液到上电泳槽中，对于选择的凝胶类型采用适当的电压和时间进

行电泳（单元 7.1）。

参考文献：Hochstrasser et al.，1988

撰稿人：Sandra Harper and David Speicher

单元 7.4　蛋白质单向平板凝胶等电聚焦电泳

基本方案　变性平板凝胶等电聚焦电泳

警告： 丙烯酰胺具有神经毒性，处理溶液时要佩戴手套。

材料（带√项见附录 1）

尿素（超纯）
10%（v/v）TritonX-100
√丙烯酰胺储液
两性电解质 pH5.0～7.0
两性电解质 pH3.5～10.0
10%（w/v）过硫酸铵（新鲜配制的储存液分装成 500μl，－20℃保存）
TEMED
20mmol/L 磷酸
待测的蛋白样品
√IEF 增溶缓冲液
稀释溶液：IEF 增溶缓冲液与水 1∶3（v/v）稀释
20mmol/L NaOH（排过气泡，现用现配）
具有玻璃板、垫片、夹子、支架和缓冲液槽的电泳装置
烧杯
梳子
电源（至少能够负载 1000V 并且总功率为 10W）
Hamilton 注射器或微量加样器

1. 用非常干净的玻璃板准备电泳装置。将垫片和夹子组装成凝胶装置并装配在支架上。
2. 在烧杯中配制丙烯酰胺凝胶溶液，按下面配方配制 10ml 凝胶混合物。
   5.5g 尿素（终浓度 9.1mol/L）
   2ml 10%（v/v）Triton X-100（终浓度 2%，v/v）
   2ml Milli Q 纯水
   1.35ml 丙烯酰胺储液
   0.4ml 两性电解质 pH5.0～7.0
   0.1ml 两性电解质 pH3.5～10.0
   溶液排气泡（5min 以上）

3. 加 20μl 10%（w/v）过硫酸铵和 10μl TEMED 以使聚丙烯酰胺聚合。灌胶至玻璃板的顶部。小心插入梳子以免产生气泡。使凝胶聚合 45min。
4. 拔去梳子将凝胶板放入电泳装置中。在下缓冲液槽中注满 20mmol/L H_3PO_4。
5. 用 IEF 增溶缓冲液配制待测的蛋白样品。在胶齿中加入的样品应不超过 100μl，即≤200μg。用 IEF 增溶缓冲液加满其余空白的胶孔。用注射器加入稀释液，小心以免冲起样品层。
6. 用一根巴斯德吸管轻轻地将 20mmol/L NaOH 加到样品层上面，直至 NaOH 溶液与凝胶板顶部齐平。用剩余的 NaOH 溶液充满上缓冲液槽。
7. 连接电源，初始电压为 20V/cm，最高不超过 50V/cm。

   警告：电泳过程中所用的电压和电流比较危险，可能会致命。

   阴极在顶部（含有 NaOH 的缓冲槽），阳极在底部（含 H_3PO_4 的缓冲槽）。最好用额定功率和电压限制的电源进行凝胶电泳。
8. 凝胶电泳 13～16h（一块凝胶有 20cm 的分离距离）。
9. 停止电泳断开电源，撤下电泳装置。从槽中取出玻璃胶板。
10. 如果有必要，处理凝胶可采用染色（单元 7.6）、电转印（见支持方案）或凝胶照像（单元 7.8）。用装置中的工具移动玻璃板直接托到合适的溶液中。用小刀切下凝胶的一角，继续使凝胶自然地从玻璃板上脱离下来。水平拖动玻璃板至装有液体的容器中，使胶落入容器的距离最短以防凝胶破损。

支持方案　变性等电聚焦平板凝胶的电转印

基本方案可能会引起分离多肽的凝胶在标准电转印程序（单元 7.7）中受到限制。因为可能在电转印的过程中会非常明显地减少转移到膜上的蛋白量，所以必须除去凝胶中的非离子去垢剂（包含在 IEF 凝胶配方中）；同时也必须使 SDS 与蛋白质结合。只有通过反复洗涤凝胶才能达到以上两种情况：将胶浸没在含有 10 倍凝胶量的 50%甲醇/1%(w/v)SDS/5mmol/L Tris·Cl(pH8.0)的溶液中，洗涤凝胶 5 次，每次 10min，并且每次洗涤要更换溶液。较为便宜的方法是，倒出用过的洗液，将胶放在大小合适的纸巾或滤纸上，直接在表面上洗，或者倾去液体时可用纸巾或滤纸防止凝胶滑出容器。洗涤完毕后，准备凝胶电转印。

参考文献：Benaroch et al.，1995；Eichholtz et al.，1992

撰稿人：Hidde L. Ploegh

单元 7.5　蛋白质的琼脂糖凝胶

基本方案　琼脂糖凝胶电泳和印迹的免疫检测

材料（带√项见附录 1）

电泳级琼脂糖（Bio Whittaker 或相当品质）

√1×电泳缓冲液，4°C

蛋白质样品

√2×上样缓冲液

0.25×不含甲醇的转移缓冲液

含5%（w/v）脱脂奶粉的封闭缓冲液（单元7.7），新鲜配制

抗体：

一抗：蛋白质的兔抗体（如用于检测Willebrand组分的anti-vWF，Dako）

二抗：辣根过氧化酶偶联的驴抗兔的免疫球蛋白（Amersham Pharmacia Biotech）

ECL免疫印迹分析系统（Amersham Pharmacia Biotech）

铝箔

沸水浴（可选）

水平凝胶电泳装置（Life Technologies）或相当的设备

Teflon梳子（如1mm×9mm，20个梳齿）

平头微量注射器

0.45μm Immobilon-P聚偏二氟乙烯（PVDF）膜（Millipore）

1. 称1.2g电泳级琼脂糖放入盛有200ml 1×电泳缓冲液的250ml的烧杯中。加一个Teflon磁力搅拌转子，用铝箔将瓶口封紧。在沸水浴中加热，缓慢搅拌以防气泡，直到溶液变澄清。或选用微波炉煮沸。

   注意：只要用微波炉加热就可能会暴沸。一定要配备防护手套、防护服和防护眼罩。
2. 按照厂商使用指南组装水平凝胶电泳装置。
3. 使琼脂糖冷却到55～60℃，将熔化的琼脂糖倾倒进电泳设备中使胶高为4mm。小心插入配置的Teflon梳子以防有气泡产生。
4. 待琼脂糖凝固后，将胶板放置于4°C使琼脂糖定形20～30min。
5. 在4℃，将电泳缓冲液倒入胶板，并使其没过2～3mm。缓慢向上拔出梳子。
6. 用蒸馏水稀释蛋白样品至两倍的样品浓度。立即将稀释的样品加到等量的2×上样缓冲液中。加样量为10～15μl，用平头微量注射器将样品加到每个加样孔中。
7. 恒流25mA电泳30min或直到样品示踪染料完全进入凝胶。暂停电泳，降低电泳缓冲液至胶面1mm。增加恒定电流至50mA再电泳3～4h，或直到指示染料移出至少6～7cm。
8. 将免疫印迹用转移槽系统转移到0.45μm Immobilon-P聚偏二氟乙烯（PVDF）膜上。检测蛋白质重要的是选用适当的一抗和二抗并通过化学发光法显影（单元7.7）。

参考文献：Hoyer and Shainoff，1980；Krizek and Rick，2000；Shainoff，1993

撰稿人：Dennis M. Krizek and Margaret E. Rick

单元 7.6　凝胶中蛋白质的染色

警告： 所有染色步骤应在室温下进行。

基本方案 1　考马斯亮蓝染色

注意： 冰乙酸和甲醇易挥发并且具有毒性，配制脱色液或储藏液时需在通风橱中进行，染色过程中要佩戴手套。

材料（带√项见附录 1）

聚丙烯酰胺凝胶（见单元 7.1、单元 7.2、单元 7.3）
√考马斯亮蓝染液
脱色液：用双蒸水配制 30%（v/v）甲醇/10%（v/v）乙酸（室温储藏 4 个月）
储藏液：用双蒸水配制 7%（v/v）乙酸/5%（v/v）甲醇（室温储藏 4 个月）
带盖子的塑料容器
平台混匀器（可选）

1. 将聚丙烯酰胺凝胶放在塑料容器中加入大量的（约 10 倍体积）的考马斯亮蓝染液。旋转摇床中缓慢摇动，胶厚度≤1mm 时摇 20min 以上，胶厚度＞1mm 时摇 1h 以上。
2. 倾去考马斯亮蓝染液并用双蒸水简单冲洗凝胶。
3. 加入 10 倍体积的脱色液缓慢摇动，直到溶液颜色变得和胶板颜色一样深。倾去脱色液，重复脱色数遍直到背景较为清晰。
4. 加入 10 倍体积的储藏液缓慢摇动 10～15min。表 7.6.1 列出了可能出现的问题。

   这样，凝胶能在含储藏液的塑料容器或封闭的塑料袋中于 4℃保存几个月。或者浸在 2%（v/v）甘油中 15～30min，放在 Whatman 3MM 的滤纸上，真空干燥。

表 7.6.1　考马斯亮蓝染色的问题指南

问题	原因	解决办法
没有条带		
背景完全空白	蛋白质的量低于检测的限制范围	检查最初的蛋白样品的浓度；用银染法染色（基本方案 2）
背景太暗	脱色不够染色液太旧（即甲醇蒸发了）	继续脱色至背景干净
蛋白条带不清晰	染色时间不够	配制新的考马斯亮蓝染液
	脱色过度	延长染色时间重新染色
		重新进行凝胶染色，监控脱色过程中蛋白条带和背景颜色
高背景区域		
受蛋白泳道限制的高背景区域	样品中的干扰物	在染色前将蛋白样品与 TCA 混合
凝胶表面的蓝色斑点	在处理凝胶过程中沉淀到凝胶表面的粉末或污垢	佩戴干净、没有滑粉的手套，小心用手套清除凝胶表面的粉末或污垢

备择方案　等电聚焦后进行考马斯亮蓝染色

警告： TCA 具有非常强的腐蚀性。在配制和处理 TCA 溶液时注意保护眼睛，佩戴手套。

附加材料（同见基本方案 1；带√项见附录 1）

聚丙烯酰胺等电聚焦凝胶电泳（见单元 7.3、单元 7.4）
20%（w/v）TCA 水溶液
√IEF 考马斯亮蓝储液（见配方）
10%（w/v）$CuSO_4$ 水溶液（室温可储藏 4 个月）

1. 配制混有 90ml 脱色液、10ml IEF 考马斯亮蓝染液和 1ml 10%（w/v）$CuSO_4$ 水溶液的新鲜染色液。
2. 从等电聚焦电泳装置中取出聚丙烯酰胺凝胶，放入 5～10 倍体积 20%（w/v）TCA 水溶液中，缓慢摇动 30～60min。
3. 倾去 TCA 溶液加入 10 倍体积的脱色液，缓慢摇动 15min。
4. 弃去脱色液加入新鲜配制的染色液，对于胶厚度≤1mm 的凝胶缓慢摇动孵育 20min 以上，胶厚度>1mm 的要孵育 1h 以上。
5. 倾去染色液，用双蒸水简单冲洗。
6. 凝胶脱色（见基本方案 1，步骤 3）。

基本方案 2　银染法

警告： 冰乙酸和甲醇易挥发并且具有毒性，配制脱色液或储藏液时需在通风橱中进行，染色过程需要佩戴手套。

注意： 配制所有的溶液都要用去离子水（Milli-Q 或 HPLC 级）。手套也要用蒸馏水清洗。处理凝胶要用干净的钝头镊子或带干净的手套接触凝胶的边角。

材料（带√项见附录 1）

任意固定或未固定的考马斯亮蓝染色的聚丙烯酰胺凝胶（见基本方案 1，支持方案1）
去离子水（HPLC 级或 Milli-Q）
50%（v/v）乙醇水溶液
√固定液
√硫代硫酸盐溶液
√硝酸银溶液
√显影液
50%（v/v）甲醇/12%（v/v）乙酸水溶液
50%（v/v）甲醇水溶液

带盖子的塑料容器

干净的塑料器皿（至少 6 个；塑料吸头盒的盖子适合于染小块胶）

铝箔

平台混匀器（可选）

1. 对于未固定的凝胶：从电泳装置中卸下聚丙烯酰胺凝胶，放入有足够体积（10 倍体积）固定液的塑料容器中，缓慢摇动 30min 以上。
2. 转移凝胶到 10 倍凝胶体积的 50％乙醇（v/v）去离子水溶液中。缓慢摇动孵育 20min。重复 2 次（最多重复 3 次）。
3. 将凝胶浸入 10 倍体积的去离子水中，缓慢摇动 5～10min。
4. 倾去水溶液再加 10 倍体积的硫代硫酸盐溶液，准确缓慢摇 1min。
5. 再将凝胶转移到有 10 倍体积去离子水的塑料容器中准确孵育 20s。重复 2 次（最多重复 3 次）。
6. 转移凝胶浸入 5～10 倍体积的硝酸银溶液中，避光缓慢摇动 20min。
7. 再用 10 倍体积的去离水准确孵育 20s。重复 1 次。
8. 转移凝胶到有 10 倍体积显影液的塑料容器中，缓慢摇动直到蛋白条带清晰可见（或凝胶带逐渐变暗）。
9. 再将凝胶放入含有 10 倍体积的去离子水的干净塑料容器中，孵育 30s。换水再孵育 30s。
10. 将凝胶浸入 10 倍体积的 50％甲醇/12％乙酸的去离子水中缓慢摇动 10min。
11. 倾去溶液再加 10 倍体积的 50％甲醇。见表 7.6.2 问题指南。

表 7.6.2　银染的问题指南

问题	原因	解决办法
蛋白条带缺失或不清晰		
背景空白	蛋白质的量低于检测的限制范围	检查蛋白样品初始浓度
	影像润色不足	重染色，延长显色时间直到背景开始变暗
	甲醛时间过久（在浓缩溶液中有白色聚合物）	用新鲜的甲醛浓缩液
	硝酸银溶液不新鲜	在使用前配制新鲜的硝酸银溶液，不要用混浊的溶液
背景太暗	凝胶过度显影	不断监控显色过程，一染色好就开始下一步操作
	试剂质量差	用最高纯度品质的试剂，用 HPLC 级的水配制溶液
条带影像和背景色显现太快	显影液中的硫代硫酸盐溶液和硫代硫酸盐溶液浓度不理想	增大两种溶液中硫代硫酸盐浓度（2～3 倍），不要重复使用溶液
金属银在胶表面沉淀	在凝胶处理过程中粉末或污垢沉淀到凝胶的表面	处理凝胶要用干净的镊子和手套
	在硝酸银溶液中存在金属银	避光保存溶液，不要用浑浊的溶液

基本方案 3　蛋白质凝胶的荧光检测

警告：SYPRO Ruby 染料具有毒性，它是由有机化合物和钌组成的，还未得到充分的鉴定。在染色过程中需戴手套，按照本地环境规则处理染色液，要加入活性炭，活性炭可吸附染料。

注意：避光保存 SYPRO Ruby 染色的蛋白凝胶。如果装凝胶的塑料容器为透明的则需用铝箔包裹。

材料

聚丙烯酰胺凝胶电泳（见单元 7.1、单元 7.2 或单元 7.3）
SYPRO Ruby 蛋白染料（Molecular Probe）
蒸馏水
带盖子的塑料容器（塑料吸头盒的盖子适合于染小块胶）
平台摇床（可选）
300nm UV 紫外灯
照相机或 CCD 相机（可选）

1. 从电泳装置中卸下聚丙烯酰胺凝胶，放入有足够多（10 倍体积）SYPRO Ruby 蛋白染液的塑料容器中，缓慢摇动 3h。
2. 倾去 SYPRO Ruby 蛋白凝胶染液，用水简单冲洗，加入 10 倍体积的蒸馏水缓慢摇动孵育 10min。换水再摇 10min。
3. 在 300nm 的紫外灯上观察蛋白的荧光条带。见表 7.6.3 的问题指南。

警告：使用防 UV 眼睛保护措施避免 UV 射线直接射到眼睛。

表 7.6.3　荧光染色的问题指南

问题	原因	解决办法
蛋白条带缺失或不清晰		
背景空白	蛋白质的量低于检测的限制范围	检查最初的蛋白样品的浓度。用银染法染色（基本方案 2）
	直接肉眼观察不明显	用 CCD 相机或摄像显现蛋白条带
	照相状态的和成像状态不一致	用敏感的或适合 CCD 相机的相纸（黑白 Polaroid667或类似的）。延长曝光（综合）时间
	染色液使用太久或对光敏感	用新鲜的染液，避光，不要重复使用
	蛋白质预染色或一端带有有色的基团	如果可能，除去蛋白有色基团并避免用预染色蛋白。或用其他染色方法（基本方案2或4）
高的荧光背景	在凝胶中存在太多游离的染料	用水进一步冲洗凝胶（重复步骤 4～5）
	观察时凝胶在自荧光的塑料表面如纱纶包装膜（Saran Wrap）	直接将凝胶放置在 UV 灯表面
	凝胶被附上了一层亲合染料的聚酯表面（如 PhastGels）	显色凝胶时去除聚酯层
在 SDS-PAGE 凝胶前沿染色过重	在凝胶前沿 SYPRO 染料结合于 SDS 形成的胶束	在电泳时可将 SDS 前沿跑出凝胶
凝胶表面的旧标记	由于操作不慎部分挤压凝胶或凝胶表面沉淀粉末	用干净的手套小心处理凝胶

基本方案 4　可逆蛋白锌染法

材料

含有目标蛋白的聚丙烯酰胺凝胶（单元 7.1）
Code E-Zinc 凝胶可逆染色试剂盒（Pierce），含有：
　E-Zinc 染料
　E-Zinc 显影剂
　E-Zinc 脱色剂
蒸馏水
带盖子的塑料容器
平台摇床（可选）

1. 从电泳装置中取出聚丙烯酰胺凝胶，放入有 10 倍体积 E-Zinc 染液的塑料容器中，缓慢摇动 10min。
2. 倾去 E-Zinc 染料溶液再放入 10 倍体积的 E-Zinc 显影液，缓慢摇动 1～2min，一旦显色良好立即进行下一步。
3. 倾去 E-Zinc 显影液，再将凝胶浸入 10 倍体积的蒸馏水中。缓慢摇动 1min 后换水。
4. 将聚丙烯酰胺凝胶放置在暗色的（黑色或蓝色）背景中观察蛋白条带。
5. 将凝胶浸入 10 倍体积的 E-Zinc 脱色剂中直到凝胶条带完全清晰（5～10min）。
6. 用水清洗凝胶。见表 7.6.4 的问题指南。

表 7.6.4　锌染的问题指南

问题	原因	解决办法
蛋白条带缺失或不清晰	因为观察背景较亮而至对比度不当	放置在较暗的背景下观察凝胶的显影条带
	凝胶过分显影	将凝胶脱色再染色，并监控条带在暗背景的显现
	蛋白质含量低于检测范围	检查蛋白质的初始浓度，用银染方法进行凝胶染色（见基本方案 2）
背景未变透明	染色液或显影液时间过久	用新鲜的染液和显影液（不要反复使用）

参考文献：Blum et al.，1987；Choi et al.，1996；Steinberg et al.，1996
撰稿人：Esteban C. Dell'Angelica and Juan S. Bonifacino

单元 7.7　免疫印迹和免疫检测

注意：当处理凝胶和滤膜时，应戴无尘干净手套。

基本方案1　用转移槽转印蛋白质

材料（带√项见附录1）

待分析样品

预染色的（Sigma或Bio-Rad）或生物素酰化的（Vector Labs或Sigma）标准分子质量蛋白质（单元7.1.2）

√转移缓冲液

无粉尘手套

Scotch-Brite垫（3M）或与之相当的海绵

Whatman 3MM滤纸及相当品

转移膜：0.45μm硝酸纤维素膜（Millipore或Schleicher & Schuell），PVDF膜（Millipore Immobilon），中性尼龙膜（Pall Biodyne A）或带正电荷的尼龙膜（Pall Biodyne B；Bio-Rad Zetabind）

电转仪（EC Apparatus，Bio-Rad或Amersham Pharmacia Biotech）

不掉渍的圆珠笔或软铅笔

1. 制备抗原样品，并用小型或标准尺寸的单向或双向凝胶（见单元7.1，单元7.3）分离蛋白质，在一个或多个泳道中分离预染色或生物素酰化的标准分子质量蛋白质分子。
2. 电泳完成后，拆卸凝胶夹层，去除浓缩胶。以适量的转移缓冲液室温平衡凝胶30min。
3. 组装转移盒（图7.7.1），放入一个较大的托盘中，加足量的能够盖没整个转移盒的转移缓冲液。在塑料转移盒的底部，依次将下面的物品组装转印夹层：Scotch-Brite垫或海绵；一张剪切得如凝胶大小的滤纸，并预先以转移缓冲液湿润凝胶。
4. 将凝胶放到滤纸上，凝胶朝向滤纸的一面应是凝胶的阴极面（也就是说当放进转移槽时，始终是朝向负极的）。用一试管或玻璃棒在凝胶表面缓慢滚动，以排除凝胶与滤纸之间的气泡。
5. 准备转移膜：按凝胶大小但各边都比凝胶大约1mm剪膜。成45°角慢慢地将膜放入蒸馏水中，水将会渗进膜中并湿润整个表面，然后再转移到缓冲液中平衡10～15min。

   浸湿过程仅用于硝酸纤维素膜和尼龙膜；PVDF膜则在100%的甲醇溶液中短暂地放1～2s，然后在转移缓冲液中平衡10～15min。
6. 用转移缓冲液润湿凝胶表面。直接将一张润湿的膜放在凝胶的顶部（即阳极面），按步骤4排去气泡。
7. 润湿另一张Whatman 3MM滤纸，并置于膜的阳极面，排去气泡。在滤纸的顶部放另一块Scotch-Brite垫或海绵。将转移盒顶部的半面放置合适，扣紧，完成组装（图7.7.1）。
8. 加入转移缓冲液，按正确的极性方向（膜朝向阳极）将转移盒放进电转仪中，连接

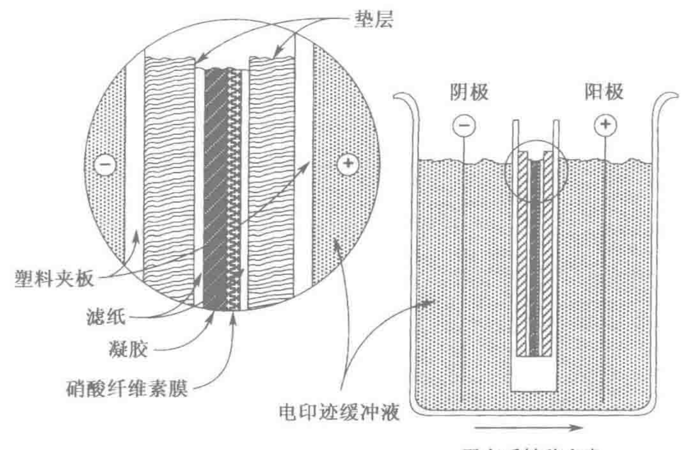


图 7.7.1 利用转印槽进行免疫印迹

将含有蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶置于一张滤纸上，凝胶向上的一面盖上一张预先剪好、各边均比凝较大 1～2mm 的膜，然后再往膜上盖上另一张滤纸。将滤纸连同凝胶和膜一起夹在 Scotch-Brite 垫之间。此夹层放入塑料夹子中，然后整体放入盛有转移缓冲液的槽中。如转印带负电荷的蛋白质，膜放于凝胶的阳极面；而转印带正电荷的蛋白质时，膜放于凝胶的阴极面，带正电荷的蛋白质从凝胶电转移到膜上。电转在 100V 下 1～2h 完成（需冷却），或 14V 过夜

电源。

9. 电泳转移蛋白质到膜上，在冷却条件下 100V 电压 30～60min，或在冷室 14V 恒压电转过夜。
10. 断开电源，拆卸转印装置，取出转印膜，并在膜上剪一小角用软铅笔、不掉渍的圆珠笔作上位置标记。
11. 用考马斯亮蓝染凝胶上的总蛋白以确定转移效率。需要时也可将硝酸纤维素膜或 PVDF 膜以支持方案 1 提供的可逆染色方法使蛋白质显迹，也可用如考马斯亮蓝、印度墨水、萘酚蓝或胶体金进行不可逆染色。
12. 进行蛋白质的免疫杂交和显迹（见基本方案 2，基本方案 3，备择方案 2）

备择方案 1 用半干转移系统转印蛋白质

附加材料（同见基本方案 1）

6 张 Whatman 3MM 滤纸或相当的滤纸，剪切的如凝胶大小，并以转移缓冲液浸润。

半干转移装置（Amersham Pharmacia Biotech、Bio-Rad 或 Sartorius）

1. 准备样品，并在小型或标准尺寸的单向或双向凝胶上分离蛋白质（见单元 7.1，单元 7.2，单元 7.3）

丙烯酰胺浓度百分比（分离胶）/%	5～7	8～10	13～15	18～20
被转移蛋白质的大小（效率约为 100%）	29～150kDa	14～66kDa	<36kDa	<20kDa

2. 准备转印膜。
3. 拆卸凝胶夹层，除去浓缩胶。
4. 将三张以转移缓冲液浸润的滤纸放在阳极面（图 7.7.2）。

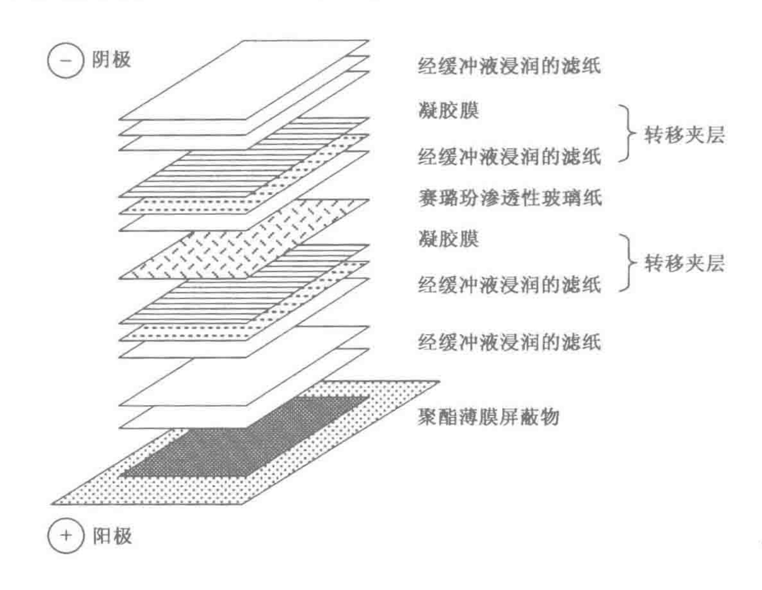


图 7.7.2 半干转移法免疫印迹

通常下面的电极是阳极，并且一次只转移一块凝胶。将一块 Mylar 罩（在某些装置中可选）放置在阳极上，接着放置 3 层转移缓冲液浸润过的滤纸、膜、凝胶、3 层转移缓冲液浸润过的滤纸。转移多块凝胶时，如图所示转移塔装置，每个转移节间放一块玻璃纸，转移带负电荷的蛋白质，膜放在凝胶的阳极一侧，转移正电荷的蛋白质，膜放在凝胶的阴极一侧，0.8mA/cm² 凝胶面积的电流可转移成功，典型的微凝胶（8cm×10cm）和标准大小的凝胶分别为 60mA 和 200mA

5. 在滤纸上放上已平衡的转印膜。用一试管在膜表面缓慢滚动，排去膜与滤纸之间的气泡。将凝胶放在膜上，同样用一试管在凝胶表面缓慢滚动使膜与凝胶紧密结合。
6. 再在凝胶上放上三张转移缓冲液浸润的滤纸，按上述方法排除气泡，就完成了凝胶夹层的组装。
7. 再转移夹层的顶部放置顶电极。小心将高压导线和电源相连。恒流下转移蛋白质，并使温度不要超过 45℃，通常只需转移 1h。

   一般地，电流不要超过 0.8mA/cm²。
8. 转移后，关闭电源，拆卸转移装置。取出膜，标记好凝胶方向，进行染色和免疫探测。

支持方案 1　转印后蛋白质的可逆染色

为验证转印效率，可进行硝酸纤维素膜和 PVDF 膜可逆染色。但这种方法不适用于尼龙膜。

附加材料（同见基本方案 1；带√项见附录 1）

√丽春红 S 染料溶液

1. 在室温将转有蛋白质的硝酸纤维素膜或 PVDF 膜放入丽春红 S 染液中染色 5min。
2. 在水中脱色 2min，需要时拍照，用不褪色墨水标记标准分子质量蛋白质的位置所在。
3. 在水中浸泡 10min，使之完全脱色。

基本方案 2　用二抗偶联物进行免疫检测

材料（带√项见附录 1）

转印了蛋白质的膜（见基本方案 1 或备择方案 1）
√适用于特定膜及检测方法的封闭缓冲液
针对待测蛋白质的一抗
TTBS 缓冲液（用于硝酸纤维素膜或 PVDF 膜）或 TBS（用于尼龙膜）
偶联的二抗：辣根过氧化物酶（HRP）或碱性磷酸酶（AP）与抗免疫球蛋白的偶联物（Cappel，Vector Labs，Kirkegaard & Perry 或 Sigma；按厂商说明书稀释分装为 25μl 冻存备用）。
可热密封的塑料袋
无粉尘手套
塑料盒子

1. 将膜放入可热密封的塑料袋，加 5ml 封闭液，密封塑料袋。在旋转摇床或摆动平台中室温摇动 30～60min。
2. 用封闭液稀释一抗，通常多克隆抗体的稀释度为 1/1000～1/100；对于杂交瘤培养上清液，稀释度为 1/100～1/10，含单克隆抗体的小鼠腹水，稀释度大于 1∶1000。
3. 打开袋子，倾去封闭液，以稀释的一抗工作液代替之。在室温下持续摇动 30～60min。
4. 戴手套从塑料袋中取出膜，放在塑料盒子中用 200ml TTBS（硝酸纤维素膜或 PVDF 膜）或 TBS（尼龙膜）洗 4 次，轻摇，每次 10～15min。
5. 用封闭液稀释 HRP 或 AP-抗免疫球蛋白偶联物，稀释度为 1/2000～1/200。
6. 将膜放进一新的可密封塑料袋，加入稀释的 HRP 或 AP-抗免疫球蛋白偶联物。在室温持续摇动 30～60min。
7. 从塑料袋中取出膜，并按步骤 4 洗膜。按合适的显迹方法处理膜。

备择方案2 用亲和素-生物素偶联的二抗进行免疫检测

附加材料（同见基本方案2；带√项见附录1）

√适用于特定膜及检测方法的封闭缓冲液

TTBS（用于硝酸纤维素膜或PVDF膜）或TBS（用于中性或带正电荷的尼龙膜）

Vectastain ABC（过氧化物酶）或TBS（碱性磷酸酶）试剂盒（Vector Labs）内含：A试剂（抗生物素蛋白，亦称亲和素）和B试剂（生物素化的HRP或AP）以及生物素酰化的二抗（订购时需附带膜免疫检测方法）。

1. 在旋转摇床或摆动平台中持续摇动使膜与合适的封闭液平衡。对于硝酸纤维素膜或PVDF膜，需要在室温封闭30～60min，尼龙膜则需在37℃封闭2h以上。
2. 用TTBS（用于硝酸纤维素膜或PVDF膜）或TBS（用于尼龙膜）稀释一抗，稀释度为1/100 000～1/100。
3. 打开袋子，倾去封闭缓冲液，加入足量的一抗工作液，密封袋子。在室温缓慢摇动30min。
4. 从袋子中取出膜。在TTBS（用于硝酸纤维素膜或PVDF膜）或TBS（用于尼龙膜）中洗3次，每次15min以上。
5. 稀释2滴生物素酰化二抗于50～100ml TTBS（用于硝酸纤维素膜或PVDF膜）或TBS（用于尼龙膜）溶液以制备二抗工作液。
6. 将膜移入二抗工作液中，室温缓慢摇动30min，然后按步骤4洗膜。
7. 当膜与二抗孵育时，制备亲和素-生物素酰化HRP或AP的复合物。加2滴Vectastain A试剂和B试剂到10ml TTBS（用于硝酸纤维素膜或PVDF膜）或TBS（用于尼龙膜）中室温放置30min，然后进一步稀释到50ml TTBS或TBS中。

   干酪素、脱脂奶、血清和相当级别的BSA可能会干扰亲和素-生物素复合物的形成，不要在亲和素或生物素溶液中使用这些试剂。
8. 将膜移入亲和素-生物素酰化的酶溶液中。室温慢慢摇动30min，按步骤4洗膜，每次洗30min以上。
9. 按合适的显迹方案显影（见基本方案3）。

基本方案3 用发色（光）底物显迹

通过发色体和放射性同位素方法进行检测可提高速度和敏感度。

材料

转印了蛋白质的膜

发光底物缓冲液：50mmol/L Tris·Cl，pH7.5（辣根过氧化物酶，HRP，见配方），或二氧杂环丁烷磷酸盐底物缓冲液（碱性磷酸酶，AP，见配方）

Nitro-Block溶液（仅用于AP反应）：5%（v/v）Nitro-Block（Tropix）溶于二氧

杂环丁烷磷酸盐缓冲液，现用现配。

透明的塑料保鲜膜

X 射线胶卷

1. 用 50ml 底物缓冲液洗膜 2 次以平衡膜，每次 15min。
2. 对于使用硝酸纤维素膜或 PVDF 膜进行的碱性磷酸酶反应：将膜置于 Nitro-Block 溶液中 5min，然后以 50ml 底物缓冲液洗 5min。

   采用 Lumi-Phos530 在尼龙膜上进行碱性磷酸酶反应或在任何一种膜上进行辣根过氧化物酶反应时都不需要 Nitro-Block 试剂，同时建议 Lumi-Phos530 不要用于硝酸纤维素膜。
3. 将膜移入 50ml 显迹液中，浸泡 30s（HRP 反应）或 5min（AP 反应）。取出膜，滴干水分，将膜正面朝下放在一张透明的塑料保鲜膜上，向后折叠保鲜膜将膜紧裹起来以防弄湿 X 射线胶片。
4. 在暗室中，将膜正面朝下放在感光胶片上，曝光时间取决于样品，放射自显影几秒到几个小时。
5. 如果需要，可用 50ml TBS 溶液洗膜 15min，再按基本方案 3 进行发色显迹。

支持方案 2　膜的清洗和再使用

材料

发光的免疫印迹（见基本方案 3）

0.2mol/L NaOH

1. 蒸馏水清洗 5min。
2. 再用 0.2mol/L NaOH 洗 5min。
3. 蒸馏水清洗 5min。
4. 用干酪素或脱脂奶作为封闭液继续免疫探测程序。

参考文献：Bjerrum and Schafer-Nielsen，1986；Salinovich and Montelaro，1986

撰稿人：Sean Gallagher，Scott E. Winston，Steven A. Fuller，and John G. R. Hurrell

单元 7.8　凝胶和印迹中放射性标记蛋白的检测和量化

警告：当操作放射性物质时，必须采用合适的预防措施来避免对实验人员和环境的污染。根据当地放射性安全部门主管的指导，在指定的地点进行实验和废物处理。

基本方案　放射性自显影

胶片的选择对于放射自显影是至关重要的（表 7.8.1）。双层胶片（如柯达的 X-

Omat AR 和富士的 RX）对于检测由^{32}P和^{125}I激发的高能量β粒子是理想的选择，因为它们能够穿透聚酯层使双层感光乳剂曝光。这些胶片通常与低温（－70℃）下能够强化屏幕的钨酸钙（$CaWO_4$）一起使用；它们对于屏幕激发的蓝色光非常敏感。绿色光敏感的 BioMax MS（柯达）是与 BioMax MS 强化屏幕激发的蓝绿光谱相配的双层胶片。BioMax MS 胶片/BioMax MS 强化屏幕系统通常对^{32}P最敏感（敏感度高于 X-Omat AR 胶片与$CaWO_4$屏系统 4 倍）。单层胶片含有一层感光乳胶（如柯达的 BioMax MR），对于直接曝光技术和中等能量放射性同位素（^{14}C、^{35}S和^{33}P，而不是^{3}H）是最佳的。蓝光敏感的双层 X-Omat AR 胶片一般用于荧光显影，要用 2，5-联苯唑（PPO 在 388nm 激发）、水杨酸钠（在 420nm 激发）以及商用的荧光显影液和喷剂（Amersham 和杜邦 NEN 公司），激发光在光谱蓝光末端。

表 7.8.1　放射性自显影的胶片选择和曝光温度

同位素	强化方法	胶片	曝光温度
^{3}H	荧光显影	双层	－70℃
^{35}S,^{14}C,^{32}P	无	单层	室温
^{35}S,^{14}C,^{32}P	荧光显影	双层	－70℃
^{32}P,^{125}I	$CaWO_4$ 强化屏	双层	－70℃

材料

固定干燥的凝胶（见支持方案 1）或膜（例如，来自免疫印迹，见单元 7.7）

显影剂：柯达显影液和补充物，按照厂商使用说明配制，18～20℃

定影剂：柯达定影液和补充物，按照厂商使用说明配制，18～20℃

带有木板支架和金属夹扣的金属或纸胶片盒

塑料保鲜膜

X 射线胶片

盛装胶片处理液的盘子

悬挂胶片的夹子

1. 在用安全灯照明的暗室中，将样品放入胶片盒中（如干燥的凝胶或膜）。用塑料保鲜膜封好样品以防止粘到胶片上以及放射性物质污染胶片盒。

   安全光是小于 15W、装配有 Kodak GBX-2 红色滤光器（或相当品质的滤光器）的球形灯泡所发出的光。

2. 在样品顶上放上一张 X 射线胶片，关闭胶片盒（图 7.8.1）

3. 在适当的温度下，曝光胶片特定长时间。

   如果实验组间需要量化比较，那么曝光时间和内部调控器的使用是非常重要的。

4. 曝光后，在暗室中打开胶片盒取出胶片进行后处理。

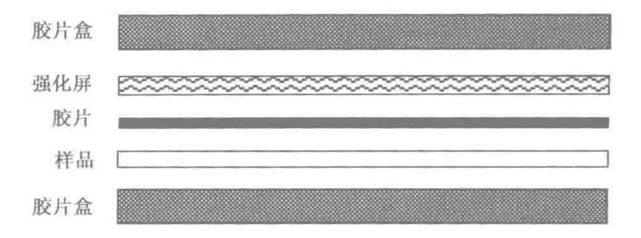


图 7.8.1 放射自显影装置：在胶片盒中的强化屏、胶片、样品

如果胶片在－70℃曝光，在进行后处理之前将胶片盒恢复到室温。避免静电放电，这可能会在放射自显影图像上产生黑斑或条带。

5. 将胶片在 18～20℃的显影液中浸泡 5min，然后室温流水冲洗 1min。
6. 将胶片在 18～20℃的定影液中浸泡 5min，流水冲洗 15min，挂起晾干。

支持方案 1 固定和干燥用于放射自显影的凝胶

材料

SDS-PAGE 凝胶（单元 7.1）
固定液：10%（v/v）冰乙酸/20%（v/v）甲醇水溶液
备选固定液（用于丙烯酰胺浓度＞15%或胶厚＞1.5mm 的凝胶）：3%（v/v）甘油/10%（v/v）冰乙酸/20%（v/v）甲醇水溶液
玻璃盘
旋转混匀器
每张至少要大于凝胶 1～2cm 的滤纸（Whatman 3MM）
塑料保鲜膜
带有真空泵的凝胶烘干机

1. 电泳后，从电泳装置中取下凝胶和玻璃板放入玻璃盘中。用金属刀片轻轻撬起玻璃板一角，小心取下上层玻璃板。在凝胶一角切下一凹口以确定凝胶方向。
2a. 对于丙烯酰胺浓度＜15%、胶厚度≤1.5mm 的凝胶：将凝胶放入盛有足够固定液的玻璃盘中，浸没凝胶。将玻璃盘放在旋转混匀器上，缓慢旋转 5min 直至样品缓冲液中的蓝色全部消失（大概总共需要 30min）。
2b. 对于丙烯酰胺浓度≥15%或胶厚度＞1.5mm 的凝胶：按照步骤 2a 固定凝胶，但是在备选固定液中浸泡 1h。
3. 倾去固定液并用去离子水冲洗凝胶几分钟。

   注意：切记泡过凝胶的溶液也带有放射性物质。
4. 小心倾去水使凝胶处于玻璃盘的中间位置。要确定任何多余的水都已去除。在凝胶上放一张 Whatman 3MM 滤纸，至少要大于凝胶 1～2cm。

5. 用塑料保鲜膜将凝胶封好。用绵纸抚平保鲜膜以除去气泡或褶皱。用一张滤纸垫着凝胶放入干燥器中以免干燥器被放射性物质污染。
6. 在干燥器中将凝胶夹层放在滤纸上，塑料膜层向上。
7. 将干燥器的垫片放在凝胶夹层上，设置合适的温度，开启凝胶干燥器（一般 80℃，如果凝胶含有氟石则为 60℃）。也可用真空泵干燥凝胶（对于 1mm 厚的凝胶普遍为 2h）。
8. 从干燥器中取出凝胶，进行下面的放射性自显影步骤（见基本方案）。

支持方案 2　强化屏的使用

强化屏用于增强胶片由放射性分子产生的图像的显像效果。它仅与强 β-放射同位素如 ^{32}P 或 γ-放射性同位素如 ^{125}I 联合使用。这些形式的射线通常能够完全穿过胶片，但能够被强化屏所吸收而产生荧光并使胶片曝光。强化屏能够充分提高胶片图像，某些图像分辨率丧失的情况是由于散光造成的。许多公司都提供实验用强化屏（如 Fisher、Sigma 和 Kodak）。

如图 7.8.1 所示，胶片放置在样品和强化屏之间。对于放射性较弱的样品，在放射性样品的另一边可放置第二个强化屏（即屏、样品、胶片、屏的结构），但是这可能因为散光而引起分辨率降低。并且样品与样品支持层必须是完全透明的，这样才能使光从第二层屏穿过到达胶片。胶片要在 −70°C 曝光以稳定放射能或屏幕发射光活化的溴化银晶体。

备择方案 1　荧光显影

为获得微弱的 β-放射同位素如 ^{3}H、^{14}C 和 ^{35}S 的放射自显影图像，放射性样品中可包括有机物质发光。水杨酸钠也用于荧光成像。与有机物质发光相比，它能够增强图像显像效果，尽管有时可能会造成胶片图像的扩散。

注意：始终要佩戴手套，水杨酸钠通过皮肤吸收会引起过敏反应。

材料

丙烯酰胺凝胶

1mol/L 水杨酸钠，pH5.0～7.0，新鲜配制

1. 如果凝胶是酸固定，在 20 倍体积的水中浸泡 1～5h 以防止水杨酸从水杨酸钠中沉淀出来。
2. 在 10 倍体积的 1mol/L 水杨酸钠，pH5.0～7.0 中浸泡凝胶 30min。
3. 干燥凝胶（见支持方案 1），继续放射自显影实验（见基本方案）。

支持方案3 光密度计量

利用放射性自显影方法获得的胶片图像能够通过光密度计量进行量化。显像密度计工作原理是比较通过样品发射光的光强度与入射光强度。倘若胶片得到合适的预曝光，那么发射光的量与凝胶中放射能的量成正比。正确的预曝光胶片的线性范围是0.1～1.0的吸光值单位。然而，如果预曝光超过这个范围，如增加大于0.2吸光值单位（A_{540}）处理胶片/未处理胶片，较少量的放射能将会产生不成比例光密度的图像。吸光值超过1.4吸光单位（A_{540}）的放射自显影图片饱和了所有可利用的溴化银晶体，并且也不能被量化了。

显像密度计从一些厂商处能买到（如Molecular Dynamics、Bio-Rad和UVP）。大多数都配有相关软件更便于计算，并使得使用者明确了所测胶片的区域。显像密度计也能用于测定样品的反射光。反射系数显像密度计用于一些特殊情况，即当样品介质完全不透明时，如利用非放射性色度检测体系探测的胶片。

备择方案2 磷光成像

磷光成像屏可以作为记录和量化放射自显影图像的一种备选胶片用以检测^{32}P、^{125}I、^{14}C、^{35}S和^{3}H等放射性同位素。

材料

凝胶或膜（如来自于免疫印迹；见单元7.7）

磷光成像系统（分子动力学）包括：

　图像消光盒

　有磷光屏的曝光盒

扫描软件

1. 擦去由于使用或由背景辐射、曝光造成的磷光屏上的任何图像。
2. 用塑料保鲜膜将凝胶或胶片封好以保护曝光盒。将凝胶或胶片放入磷光成像盒中，关上盒子开始曝光。

   曝光时间一般需要胶片曝光时间的1/10。
3. 曝光后，使屏面向下滑入磷光成像系统中。
4. 利用提供的磷光成像软件选择扫描的区域并开始扫描。
5. 进行图像的软件分析及量化。
6. 按照步骤1使磷光屏曝光而消去屏上图像。

参考文献： Chamberlain，1979；Johnston et al.，1990；Lasky，1980；Lasky and Mills，1975，1977

撰稿人： Daniel Voytas and Ning Ke

（陈鲤翔 译）

第8章 蛋白标记和免疫沉淀

对复杂混合物中细胞蛋白质的特性及其生物合成、加工、细胞内转运和降解的分析，通常都需要对蛋白质进行内标记（单元8.1）或者外标记，然后通过免疫沉淀法（单元8.5）分离标记的蛋白质，用电泳技术进行分析（第7章）。

内标记是指在蛋白质合成过程中将带标记的前体掺入其中。最常见的内标记方式包括给予活细胞标记的前体物，通过细胞自身的生物合成机制将其掺入至蛋白质当中，这种内标记形式被称为代谢标记或生物合成标记。细胞中生物合成途径的复杂性和保真性不允许进行代谢标记的前体物设计有太大的变异性，例如，氨基酸前体的化学衍生物与质膜载体和氨酰基tRNA合成酶无关。非天然氨基酸的掺入也可影响多肽链的折叠和稳定性。因此，前体的选择仅限于那些标记有其组成原子的非常用同位素。尽管稳定且分子质量大的同位素已经被用来标记前体，但迄今为止，氨基酸最常见的标记方式是用放射性核素，如^{35}S、^{3}H或^{14}C，来代替其相应的非放射性元素。由于同位素具有相同的生化特征，因此这些替代物并不影响蛋白质的合成。

本章第一单元（单元8.1）提供了应用放射性标记的氨基酸对哺乳动物细胞的蛋白质进行代谢性标记的多种方案。尽管也可应用^{35}S半胱氨酸或^{3}H标记的氨基酸，但通常优先选择^{35}S甲硫氨酸作为放射性标记的氨基酸。单元8.1描述的方案之一为脉冲标记，用放射性标记的氨基酸短时间（10～30min）内孵育细胞。脉冲标记被用于标记新合成的蛋白质。脉冲标记之后通常进行追踪，即用标记前体的未标记对应物进一步孵育细胞。脉冲-追踪方案可用于研究蛋白质合成后的去向。此单元还描述了另一种方案，即长期标记，细胞标记时间达6～32h。长期标记通常用于研究成熟蛋白质或蛋白复合物的特性，而非其生物合成。

除氨基酸外，如果蛋白质被硫酸盐、脂质、碳水化合物和磷酸盐等修饰，则可应用这些物质对蛋白质进行代谢性标记。单元8.2描述了用放射性标记的糖对碳水化合物进行代谢性标记的方法。单元8.3描述了用^{3}H棕榈酸或^{3}H肉豆蔻酸代谢性标记脂肪酰化蛋白的方法。此单元也包括确定脂肪酸连接类型以及脂肪酸特性的方法。

本章所讨论的大多数方案是基于细胞内蛋白质或蛋白偶联的内标记，但也可以通过特定氨基酸残基的化学修饰从外部标记蛋白质，常用的方法是应用^{125}I对酪氨酸残基进行化学修饰。放射性碘可用于细胞表面、分离的细胞器、去垢剂抽提物或可溶性组分中蛋白质的标记，单元8.4描述了这部分内容。蛋白质标记后仍可具有高度特异活性，通常几乎或完全没有丧失功能。但是，由于放射性碘具有挥发性，有吸入导致污染的危险，因此，由更安全的外标记技术如生物素标记替代放射性碘标记技术。

代谢性标记的蛋白质可以直接通过电泳进行分析（单元7.1），但通常通过免疫沉淀的方法来分离特异的代谢性标记蛋白与其他细胞蛋白。当代谢性标记的蛋白质经第6章所描述的物理方法初步分离后，最终也不得不通过免疫沉淀的方法来分离特异性蛋

白。免疫沉淀技术是利用免疫系统能够产生几乎针对任何蛋白质的特异抗体的能力（参见第4章）。在最常用的免疫沉淀方案中，抗体与蛋白A——琼脂糖珠（agarose bead）结合，随即被固定的抗体与细胞去垢剂抽提物一起孵育。然后，通过反复洗涤珠子可快速地将特异蛋白与混合物中的其他蛋白质分离开。单元8.5描述了一系列从细胞抽提物中免疫沉淀蛋白质的简单方案。本章描述的是在变性或非变性条件下从贴壁和悬浮的动物细胞中抽提蛋白质的方法。单元8.5也包括抗体与蛋白质-琼脂糖珠结合、抗体结合珠子与细胞抽提物的孵育以及洗涤珠子的步骤。最后，此单元描述了免疫沉淀-回收方案，蛋白质先后两次与同一抗体或不同的抗体进行免疫沉淀。此种方法可用于降低第一次免疫沉淀的非特异背景，或分析多种蛋白复合物的成分和组合。

酿酒酵母（*Saccharomy cescerevisiae*）被广泛用作研究所有真核细胞共有的细胞过程的生物体模型，这些研究的关键点是代谢性标记酵母蛋白的能力。酵母蛋白的代谢性标记和免疫沉淀可以通过本章所描述的哺乳动物蛋白质的修饰方法实现（单元8.1，单元8.5）。单元8.6描述了用^{35}S标记的氨基酸混合物进行代谢性标记酵母蛋白的方法，以及用玻璃珠机械裂解标记的酵母细胞的方法。此外，单元8.6还包括通过酶裂解细胞壁的方法，从放射性标记的酵母菌细胞中制备原生质的方法，以及用内切糖苷酶H处理免疫沉淀的酵母蛋白的方法。此单元也讨论了除用^{35}S标记的氨基酸混合物之外的前体代谢性标记酵母细胞的标准。

撰稿人：Juan S. Bonifacino

单元8.1 用放射性标记的氨基酸进行代谢性标记

代谢性标记技术用于研究蛋白质的生物合成、加工、细胞内转运、分泌、降解及其物理化学特性。本单元描述了采用放射性标记的氨基酸进行代谢性标记哺乳动物细胞的方法（表8.1.1）。

表8.1.1 用于蛋白质代谢性标记的放射性氨基酸

氨基酸[a]	频率/%[b]	放射性同位素	比活性（Ci/mmol）	备注[c]
亮氨酸	10.4	^{3}H	5～190	E
丝氨酸	8.1	^{3}H	5～0	T，I
谷氨酸	7.3	^{3}H	15～80	T，I
赖氨酸	7.0	^{3}H	40～110	E
丙胺酸	7.0	^{3}H	10～85	T
缬氨酸	6.2	^{3}H	10～65	E
甘氨酸	5.7	^{3}H	10～60	T，I
苏氨酸	5.6	^{3}H	5～25	E
精氨酸	5.0	^{3}H	30～70	E
天冬氨酸	4.9	^{3}H	10～50	T，I
脯氨酸	4.9	^{3}H	15～130	—
谷氨酰胺	4.5	^{3}H	20～60	T，I
苯丙氨酸	4.5	^{3}H	15～140	E
酪氨酸	3.6	^{3}H	15～60	—
天冬酰胺[d]	3.5	—	—	—

续表

氨基酸[a]	频率/%[b]	放射性同位素	比活性（Ci/mmol）	备注[c]
半胱氨酸	3.4	^{35}S	>800	—
异亮氨酸	2.9	^{3}H	30～140	E
组氨酸	2.5	^{3}H	30～70	E
甲硫氨酸	1.8	^{35}S	>800	E
色氨酸	1.3	^{3}H	20～30	E

a. 表中所有的氨基酸都为左旋构象。

b. 蛋白质中氨基酸残基的频数摘自（Lathe 1985）。

c. E，必需氨基酸；T，经过转氨作用修饰的氨基酸（Coligan et al.，1983）；I，由细胞将其转变成其他氨基酸的氨基酸。

d. 天冬酰胺较难标记（Coligan et al. 1983）。

注意：所有与活细胞接触的溶液和仪器必须采用相应的无菌技术消毒。除特殊情况外，所有培养孵育应在具有一定湿度的、37℃、含5%CO_2的培养箱中进行。某些培养基（如DMEM）可能需要改变CO_2的浓度以使pH维持在7.4。

使用^{35}S标记的化合物的安全预防措施

当使用放射性物质时，应采取适当的预防措施以避免实验者和周围环境的污染。实验的实施和废物的处理应按照当地放射安全办公室提供的指导方法在适当的指定地点进行。

已发现含有^{35}S标记化合物的液体可以释放挥发性的放射活性物质，因此，在使用^{35}S标记的氨基酸时，除了采取处理放射活性物质的常规安全措施外，尚应采取的其他预防措施，包括：

1. 含有^{35}S标记化合物的小瓶应在指定的装备有活性炭过滤器的通风橱中进行操作，这包括液体的融化、瓶子的开启以及放射标记的氨基酸加入到标记培养基中的过程。瓶子开启前，先用装有活性炭的注射器的针头使瓶子排气。由于可能造成污染，要避免用进行组织培养的通风橱。
2. 减少含^{35}S的液体在空气中的暴露时间。
3. 应用指定的水浴锅、培养箱和离心机进行放射活性物质的操作。将含有一层活性炭的盘子置于CO_2培养箱中，以降低细胞标记过程中释放到空气中的^{35}S标记化合物的含量，也可以将装有活性炭（β-Safe、Schleicher & Schuell）的过滤器粘在组织培养皿的盖子上。
4. 通过擦拭试验监测标记操作过程中所涉及的区域。
5. 采取适当的预防措施快速处理固体和液体^{35}S的废弃物。

基本方案　^{35}S甲硫氨酸脉冲标记悬浮细胞

材料（带√项见附录1）

^{35}S甲硫氨酸（>800Ci/mmol）或^{35}S标记的蛋白水解产物（>1000Ci/mmol）

√脉冲标记培养基，加温至37℃。

悬浮细胞（如Jurkat、RBL、K562、BW5147、T和B杂交瘤细胞），在具有一定湿度、37℃、含5%CO_2的培养箱中培养的，或来源于组织的。

√PBS，冰预冷

用以去除液体放射活性废物的带阀门的真空抽吸器

1. 室温解冻^{35}S甲硫氨酸，用温育（37℃）的脉冲标记培养基配制成0.1～0.2mCi/ml的工作液。含^{35}S甲硫氨酸的培养基置于拧紧盖子的管中，37℃温育（>60min）。
2. 室温300g离心5min，收集悬液中$0.5\times10^7\sim2\times10^7$个细胞。用约10ml温育的脉冲标记培养基洗涤细胞。室温300g离心5min，弃上清。温和吹打管底重新悬浮细胞，重复洗涤。
3. 用温育的脉冲标记培养基重新悬浮细胞，使之浓度为5×10^6个/ml。37℃水浴中孵育15min耗尽细胞内的甲硫氨酸。定时上下翻转离心管重新悬浮细胞。室温300g离心5min，弃上清。
4. 用2ml ^{35}S甲硫氨酸工作液（步骤1）在新的15ml离心管中重新悬浮细胞。盖紧离心管，在37℃水浴中孵育细胞10～30min，不断地轻轻翻转离心管使细胞悬浮。
5. 4℃，300g离心细胞5min，弃上清。加入10ml冰预冷的PBS温和转动离心管使细胞重新悬浮，再次离心。适当洗涤，去除放射活性培养基。
6. 供选择：用三氯乙酸（TCA）沉淀法确定所结合标记物的含量（见支持方案1）。
7. 处理和分析样品。

备择方案1　^{35}S甲硫氨酸脉冲标记贴壁细胞

附加材料（同见基本方案）

贴壁细胞（如HeLa、NRK、M1、COS-1、CV-1或原代培养的成纤维细胞或内皮细胞）

100mm组织培养皿

1. 100mm组织培养皿中生长至80%～90%汇合度的贴壁细胞（$0.5\times10^7\sim2\times10^7$个细胞）。
2. 按上述方法配制^{35}S甲硫氨酸工作液（见基本方案，步骤1）。
3. 弃去培养皿中的培养基，加入10ml温育（37℃）的脉冲标记培养基，温和转动洗涤细胞2次，每次洗涤后弃去培养基。最后加入5ml温浴的脉冲标记培养基，在具有一定湿度、37℃、5%CO_2的培养箱中孵育15min，以耗尽细胞内的甲硫氨酸。
4. 弃培养基，加入2ml ^{35}S甲硫氨酸工作液（来自步骤2），CO_2培养箱中孵育10～30min。
5. 弃去标记的培养液，10ml冰预冷的PBS洗涤细胞1次，弃去PBS。适当洗涤，去除放射活性培养基。
6. 加入10ml冰预冷的PBS，用一次性塑胶刮刀或细胞刮刮取细胞。将细胞悬浮液转移至15ml离心管中，4℃，300g离心5min，弃上清。
7. 供选择：用三氯乙酸（TCA）沉淀法确定所结合标记物的含量（见支持方案1）。

8. 处理和分析样品。

备择方案 2 ^{35}S 甲硫氨酸脉冲-追踪标记细胞

脉冲-追踪方案用于分析时间依赖性的进程，如新合成蛋白质的翻译后修饰、转运、分泌或降解。

附加材料（同见基本方案和备择方案 1；带√项见附录 1）

√追踪培养基，37℃

1. 每一时间点每个样品准备 $0.5\times10^7\sim2\times10^7$ 个细胞，每 $0.5\times10^7\sim2\times10^7$ 个细胞用 2ml 0.1～0.2mCi/ml 的^{35}S 甲硫氨酸脉冲标记 10～30min（见基本方案，步骤 1～4；或见备择方案 1，步骤 1～4）。
2. 弃去^{35}S 甲硫氨酸工作液，用 10ml 37℃的追踪培养液洗涤 1 次，再加入 10ml 37℃的追踪培养基。

   追踪时间≤2h 时，悬浮液中细胞的终浓度应为 2×10^6 个/ml；追踪时间＞2h，则细胞终浓度应为 0.5×10^6 个/ml。对于贴壁细胞，每 100mm 培养皿的面积加 10ml 追踪培养基。
3. 37℃孵育适当的追踪时间。盖紧盖子的离心管中孵育悬浮细胞，并不时转动。于 CO_2 培养箱中孵育贴壁细胞。

4a. 对于悬浮细胞：4℃，300g 离心 5min 收集细胞。若要分析分泌或脱落的蛋白质，则保留上清。

4b. 对于贴壁细胞：刮取细胞，转移至 15ml 离心管中。4℃，300g 离心 5min，如步骤 4a 中或保存或弃去上清。

5. 供选择：用三氯乙酸（TCA）沉淀法确定所结合标记物的含量（见支持方案 1）。
6. 处理或分析样品。

备择方案 3 ^{35}S 甲硫氨酸长期标记细胞

附加材料（同见基本方案和备择方案 1；带√项见附录 1）

√长期标记的培养基，温育至 37℃

75cm^2 培养瓶

1. 用温育（37℃）的长期标记培养基配制 0.02～0.1mCi/ml 的^{35}S 甲硫氨酸工作液（见基本方案，步骤 1）。

2a. 对于悬浮细胞：制备细胞，用温育的长期标记培养基洗涤细胞 1 次（见基本方案，步骤 2）。25ml 0.02～0.1mCi/ml 的^{35}S 甲硫氨酸工作液重新悬浮 $0.5\times10^7\sim2\times10^7$ 个细胞，并转移至 75cm^2 的培养瓶中。

2b. 对于贴壁细胞：75cm^2 的组织培养瓶置于 CO_2 培养箱中培养 $0.5\times10^7\sim2\times10^7$ 个贴壁细胞（80%～90%汇合度）。用温育的长期标记培养基洗涤细胞 1 次（见备择方案 1，

步骤 3)。每个 75cm^2 的培养瓶加 25ml 0.02～0.1mCi/ml 的^{35}S 甲硫氨酸工作液。

3. 拧紧培养瓶盖，以防止^{35}S 标记化合物的挥发。于 CO_2 培养箱中孵育 16h。
4. 洗涤细胞，确定结合量（见基本方案，步骤 5 和 6；或备择方案 1，步骤 6 和 7）。
5. 处理和分析样品。

备择方案 4　用其他放射性标记氨基酸进行的代谢性标记

某些情况下，如蛋白质中甲硫氨酸的含量很低或根本没有甲硫氨酸残基时，可能需要用^{35}S 甲硫氨酸以外的放射性标记氨基酸来标记蛋白质。这种情况下，最好的选择为^{35}S 半胱氨酸或^{3}H 亮氨酸。

应用这些氨基酸标记细胞的步骤与上述方案中^{35}S 甲硫氨酸的标记相似。标记培养基中的^{35}S 甲硫氨酸替换为^{35}S 半胱氨酸或^{3}H 标记的氨基酸。使用不含半胱氨酸或任何其他相应氨基酸的标记培养基。

警告：含有^{35}S 半胱氨酸的溶液可释放出挥发性的^{35}S 标记的化合物（参见安全预防措施）。

支持方案　TCA 沉淀确定标记物的结合量

警告：TCA 具有强腐蚀性。配制和应用 TCA 溶液时应注意保护眼睛，避免接触皮肤。

材料（带√项见附录 1）

标记的细胞悬液（见基本方案或备择方案 1～4）

BSA/NaN_3：1mg/ml BSA，含有 0.02%（w/v）的叠氮化钠（NaN_3）

√10%（w/v）的 TCA 溶液，冰预冷

乙醇

与真空管道相连接的过滤器

2.5cm 玻璃微纤维过滤板（Whatman GF/C）

1. 10～20μl 标记的细胞悬液加入 0.1ml 的 BSA/NaN_3 中，置于冰上。
2. 加入 1ml 冰预冷的 10%（w/v）的 TCA 溶液。用力混匀，冰中孵育 30min。
3. 真空下，用过滤器将细胞悬液过滤至 2.5cm 的玻璃微纤维过滤板上。
4. 用 5ml 冰预冷的 10%（w/v）的 TCA 溶液和乙醇洗涤过滤板 2 次，空气中干燥 30min。适当洗涤，以去除放射活性物质。
5. 取与步骤 1 等体积的放射性标记的细胞悬液（10～20μl），滴至玻璃微纤维过滤板上，测量细胞悬液中放射性标记氨基酸的总量。空气中干燥。
6. 将步骤 4 和 5 过滤板上的细胞悬液转移至 5～20ml 的闪烁管中，加入 5ml 闪烁液，在闪烁计数器上测量放射活性。
7. 计算 TCA 沉淀的标记物与总放射活性的比值（如步骤 4 样品放射活性与步骤 5 总放射活性的比值）。

参考文献：Coligan et al.，1983
撰稿人：Juan S. Bonifacino

单元 8.2 用放射性标记的糖代谢性标记糖蛋白

哺乳动物细胞分泌性细胞器中合成的大多数蛋白都被糖基化。这些糖蛋白是分泌性和内吞细胞器的组成成分，这些细胞器包括内质网、高尔基复合体、浆膜、内吞体和溶酶体。这些糖蛋白也是细胞外的重要成分。这些分子的多糖包括与天冬氨酸残基连接的N端连接链、与丝氨酸和苏氨酸残基连接的O端连接链，后一基团包括短的黏液素型链和长的黏多糖链。对于培养细胞的糖蛋白，糖蛋白多糖的结构最好用放射标记的糖进

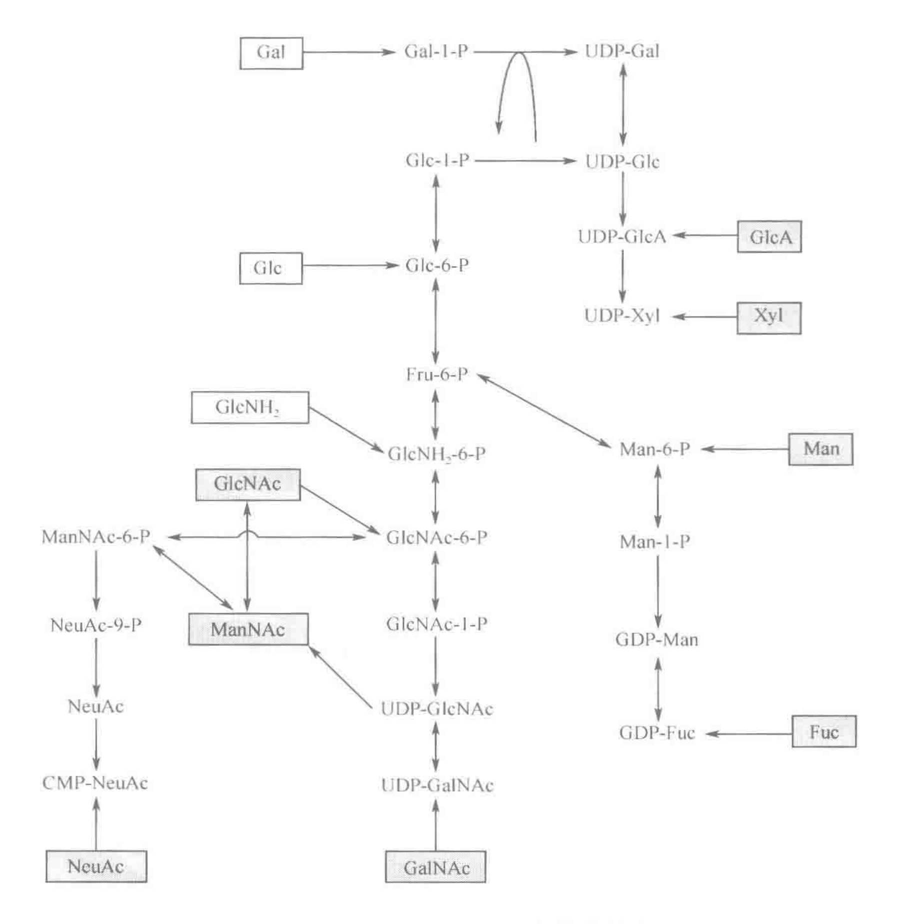


图 8.2.1 哺乳动物细胞中糖代谢通路

方框中的复合物是可被用来摄入和结合至糖缀合物（glycoconjugate）的前体物，图中所示转变成核糖供体的生物合成途径。框外的糖可与葡萄糖竞争掺入及结合这些可有效结合而可被用于标记前体（见基本方案，备择方案）。阴影框中的糖不与葡萄糖竞争，结合效率较低，仅可用于长期标记实验（见备择方案）。缩写：Fru，果糖；Fuc，岩藻糖；Gal，半乳糖；GalNAc，*N*-乙酰半乳糖胺；Glc，葡萄糖；GlcA，葡萄糖醛酸；GlcNAc，*N*-乙酰葡萄糖胺；$GlcNH_2$，葡萄糖胺；Man，甘露糖；ManNAc，*N*-乙酰甘露糖胺酸；NeuAc，*N*-乙酰神经氨酸（一种唾液酸）；P，磷酸；UDP，尿苷二磷酸；Xyl，戊醛糖。

行代谢性标记制备放射活性分子来进行研究（图 8.2.1）。

警告： 当使用放射活性物质时，应采取适当的预防措施以避免实验者和周围环境的污染。实验的实施和废物的处理应按照当地放射安全办公室提供的指导方法在适当的指定地点进行。

基本方案　用放射性标记的糖进行脉冲-追踪标记

为获得最大的放射活性前体的结合量，优化标记条件非常重要。放射活性前体必须慎重选择。首先，只有某些糖——如半乳糖（Gal）、葡萄糖（Glc）、氨基葡萄糖（Glc-NH_2）和甘露糖（Man）——能被高效结合。由于细胞对其他糖没有有效地摄入和利用途径，因此不能有效地结合其他糖。其次，许多糖前体在细胞内代谢广泛。

材料（带√项见附录 1）

生长培养基：加有经透析过的血清的组织培养基（见配方；血清浓度根据所研究细胞的生长需要而定）

组织培养细胞

√标记培养基

放射活性前体：达到最高特异活性的^{3}H 或^{14}C 标记的糖（如 30～60Ci/mmol 的^{3}H-糖）

√磷酸缓冲盐（PBS），冰预冷

1. 做小规模的预实验以确定上述最佳结合标记的孵育条件。根据这些实验，选择合适的：①放射活性前体；②细胞数量；③标记培养基；④标记培养基的体积；⑤放射活性前体的浓度；⑥标记时间。
2. 于实验前 1～2 天，培养亚汇合的单层细胞或用生长培养基制备细胞悬液，达到较高密度。适宜的细胞数量见表 8.2.1。
3. 制备足够的标记培养基（例如，含非必需氨基酸的无葡萄糖的 MEM，并添加葡萄糖至浓度约为 0.1mg/ml 及 2%～5% v/v 的经透析的血清；见表 8.2.2），用于洗涤和标记，温育至 37℃。
4. 用温和的标记培养基制备放射活性前体的储存液。如果糖溶于乙醇中，则晾干，再用标记培养基重新溶解。

5a. 对于单层细胞：弃去培养基，用标记培养基清洗 2 次（表 8.2.1）。

5b. 对于悬浮细胞：室温，200g 离心 5min。弃去上清液，用温和的标记培养基重悬（表 8.2.1）。重复 1 次，离心。

6. 加入含有放射活性前体的标记培养基。对于细胞悬液，悬浮细胞于培养基中。根据培养基中的缓冲液为 HEPES 还是碳酸氢盐，分别选择 CO_2/空气或空气中、适宜温度下孵育细胞。
7. 吸去标记培养基，如果需要分析前体的利用度，则保存。
8. 供选择：如果要做追踪孵育，用含正常水平葡萄糖的温和生长培养基洗涤细胞一次。

加入温和的生长培养基，37℃孵育一定时间。吸去培养基，如果培养基中存在分泌的感兴趣的糖蛋白，则保存以进行样品分离。将细胞置于冰上，用冰预冷的磷酸缓冲盐（PBS）洗涤数次，然后收集细胞。

表 8.2.1　种植与标记培养细胞的参数

培养	细胞数[a]	洗涤	标记[b]	追踪[c]
单层细胞				
16mm（24 孔板）	1.3×10^5	0.2ml	0.1ml	0.2～0.4ml
35mm	6×10^5	0.5ml	0.3ml	0.5～1.5ml
60mm	1.8×10^6	1ml	0.7ml	1～3ml
100mm	5×10^6	3ml	2ml	3～10ml
悬浮细胞[d]	不适用	5×10^6ml	1.3×10^7ml	$0.5\times10^6\sim2\times10^6$ml

a. 基本方案中，标记前 1～2 天按上述密度种植单层细胞。不同的细胞系细胞密度可能需要调整。当需长期追踪时，应降低细胞密度；当选用备择方案长期标记时也应降低细胞数。

b. 上述体积为建议用于标记时间为 1h 或更短的实验，如基本方案中的实验。备择方案中更长的脉冲标记和长时间的孵育则需用更大体积。

c. 对于追踪孵育，短期追踪则应用更小的体积量；对于更长时间的孵育，则需更大的体积量以供给细胞足够的营养。

d. 对于悬浮细胞，使用所示的细胞密度计算出适当的体积量。

表 8.2.2　用于糖前体物结合的含非必需氨基酸的不完全 MEM 培养基

成分	无糖	成分	无糖
NaCl	3.4g	KCl	0.2g
$NaH_2PO_4\cdot2H_2O$	79mg	$CaCl_2\cdot2H_2O$	0.13g
$MgSO_4\cdot7H_2O$	0.1g	$MgCl_2\cdot6H_2O$	—
酚红	5mg	MEM100×维生素	5ml
MEM100×非必需氨基酸	5ml	MEM100×氨基酸（含左旋谷氨酸）	5ml
D-葡萄糖	10mg	缓冲液[a]	—
$NaHCO_3$	1.1g	HEPES	2.38g

a. 如在 CO_2 存在时培养，则使用碳酸氢钠；否则，使用 HEPES。

备择方案　用放射标记的糖进行的长期标记

附加材料（见基本方案）

一次性塑料注射器和 0.2μm 的注射过滤器

1. 做小规模的预实验，优化标记量（基本方案，步骤 1）。
2. 实验前 1～2 天，用生长培养基制备细胞悬液，或在培养板上培养亚汇合的单层细胞。
3. 如上所述，用温和的生长培养基制备放射活性前体的储存液（见基本方案，步骤 4）。用一次性塑料注射器和 0.2μm 的注射过滤器过滤消毒。

4a. 对于单层细胞：弃去生长培养基，改用含有放射活性前体的培养基。

4b. 对于悬浮细胞：室温，200g 离心 5min。弃去上清液，用含放射活性前体的标记培

养基悬浮细胞。

5. 根据标记培养基中的缓冲液是 HEPES 还是碳酸氢盐，选择相应的 CO_2/空气或空气中适宜温度下孵育 12～48h。
6. 吸去标记培养基，如果存在感兴趣的糖蛋白，则保存。或者，根据需要可保存一小份液体作进一步分析。
7. 将细胞置于冰上以分离细胞糖蛋白。用冰预冷的 PBS 洗涤细胞数次，然后收集。

参考文献：Yurchenko et al.，1978

撰稿人：Martin D. Snider

单元 8.3　用放射标记的脂肪酸进行的代谢性标记

蛋白酰化是指脂肪酸共价结合到蛋白质上，最常见结合的脂肪酸为（肉）豆蔻酸酯（14：0）和棕榈酸酯（16：0）。放射标记的脂肪酸用于标记真核细胞。

警告：当使用放射活性物质时，应采取适当的预防措施以避免实验者和周围环境的污染。实验的实施和废物的处理应按照当地放射安全办公室提供的指导方法在适当的指定地点进行。

基本方案　用脂肪酸进行的生物合成标记

第 9 位和第 10 位氚化的脂肪酸可以使体外标记达到高特异活性的最佳结合，且易于探测。由于氚标记远离发生 β 氧化的羧基末端，因此可降低标记重新结合的可能性。

注意：所有与活细胞接触的液体和仪器都必须采用相应的无菌技术消毒，特殊情况除外。所有培养孵育应在具有一定湿度、37℃、5%CO_2 的培养箱中进行。一些培养基（如 DMEM）可能需要改变 CO_2 的浓度以维持 pH7.4。

材料（带√项见附录 1）

培养的细胞

适合细胞的组织完全培养基

标记培养基：含有相应经透析的血清和 5mmol/L 丙酮酸钠的组织完全培养基，37℃

5～10μCi/μl [9,10(n)-^{3}H] 脂肪酸，例如，[9,10(n)-^{3}H] 棕榈酸或 [9,10(n)-^{3}H] 肉豆蔻酸（30～60Ci/mmol；Amersham International，American Radiolabeled Chemicals，or NEN Research Products），溶于乙醇。

√PBS，pH7.2，冰预冷

√1%（w/v）SDS 或 SDS 上样缓冲液（分别用于贴壁细胞和非贴壁细胞的 SDS-PAGE）或 RIPA 裂解缓冲液（用于免疫沉淀）

√5×SDS 上样缓冲液

细胞刮刀

氮气

1. 标记实验前一天，按不同比例将细胞分成两份，加入新鲜的组织完全培养基。
2. 次日，选择70%～80%汇合生长的细胞，用最小体积的37℃的标记培养基换液。孵育1h。

   悬浮细胞应达到10^6～10^7个/ml的浓度。
3. 加入5～10μCi/μl [9，10（n）-^{3}H] 脂肪酸至终浓度为50～500μCi/ml。孵育24h。

对于贴壁细胞

4a. 培养皿置于冰上，弃去培养基。用冰预冷的PBS洗涤细胞2次。加入1%的SDS裂解细胞，进行SDS-PAGE（单元7.1），或加入RIPA裂解缓冲液，进行免疫沉淀（单元8.5），60mm的培养皿加100μl 1%的SDS，100mm的培养皿加300μl 1%的SDS，或者1ml RIPA裂解缓冲液。

   注意：放射活性培养基和洗涤液必须适当去除。

5a. 用细胞刮刀从培养皿上刮取裂解的细胞，转移至1.5ml的微量离心管中。20μl的裂解产物中加入5μl 5×SDS-PAGE上样缓冲液。所有裂解产物用于免疫沉淀。在20μl SDS上样缓冲液中重新悬浮免疫沉淀物。

   对于SDS-PAGE，应用DTT的终浓度≤20mmol/L，不煮沸样品，于80℃孵育3min。

对于非贴壁细胞

4b. 4℃，600r/min微离心细胞悬液1min，使细胞成沉淀团。轻轻倒出上清液，用1ml冰预冷的PBS重新悬浮细胞洗涤一次，再次离心。

5b. 用100μl SDS-PAGE上样缓冲液重新悬浮10^6～10^7个细胞的细胞沉淀团，裂解细胞，进行不连续SDS-PAGE（单元7.1）或加入1ml RIPA裂解液，进行免疫沉淀（单元8.5）。用20μl SDS上样缓冲液重新悬浮免疫沉淀物。

   注意：必须适当去除放射活性培养基和洗涤液。

   对于SDS-PAGE，应用DTT的终浓度≤20mmol/L，不煮沸样品，于80℃孵育3min。

6. 在SDS-PAGE微胶上分析全细胞裂解液或免疫沉淀物，每个孔道上样20μl。－20℃储存剩余的裂解产物。
7. 水杨酸钠处理凝胶（单元7.8）。用预闪胶片，－70℃摄取胶上的荧光图像（单元7.8）。

参考文献：Casey and Buss，1995

撰稿人：Caroline S. Jackson and Anthony l. Magee

单元8.4　细胞蛋白质的放射性碘化

^{125}I放射性标记是标记细胞蛋白质的一种有效方法。

使用^{125}I标记化合物的安全性预防措施

对于所有的放射活性同位素，实验者应在放射活性物质指定地点进行实验，应按照当地放射安全办公室提供的指导方法进行。由于^{125}I易被甲状腺吸收，安全指导方法中通常包括实验结束后的尿液检查和/或甲状腺扫描。

鉴于暴露于γ射线的危险性，应特别小心应用^{125}I。因此，需采取下列其他预防措施：

1. 强烈建议此实验由两个实验人员完成。一人进行标记，另一人可以提供所需要的仪器，并应用合适的碘化钠晶体探测器连续监测污染情况。
2. 含有未结合^{125}I的小瓶应在指定使用放射活性物质并配有活性炭过滤器的通风橱中打开。^{125}I极易挥发，尤其对甲状腺有害，应该防止实验人员受到^{125}I的伤害。
3. 所有工作均应在铅板后面进行，以阻挡γ射线。双层标准4cm厚的铅板足以抵挡^{125}I的伤害。
4. 当^{125}I或碘化细胞从保护性铅板后面移至通风橱中时，应使用铅片包裹，防止其对同伴的放射。而且，^{125}I标记的细胞应放在指定培养箱的铅盒中。
5. 对碘化细胞或蛋白质所有接下来的实验都应极其小心，应穿防护服，戴手套，使用空气监测器在铅板后面进行。

基本方案1　应用乳糖过氧化物酶对细胞表面进行^{125}I标记

材料（带√项见附录1）

$0.5\times10^8\sim1\times10^8$个悬浮细胞
√PBS，无叠氮化物，冰预冷
Na^{125}I（0.1mCi/μl；NEN Life Science Products，Amersham Pharmacia Biotech，或ICN Biomedicals）
√乳糖过氧化物酶溶液
30%（v/v）过氧化氢储存液
√乳糖过氧化物酶缓冲液，冰预冷
溶于PBS的10mmol/L的NaI（见配方），冰预冷
带双层4cm厚铅板的通风橱
γ计数器和合适的计数瓶

1. 4℃，500*g*离心$0.5\times10^8\sim1\times10^8$个悬浮细胞5min，使细胞沉淀成团。25ml冰预冷的PBS（无叠氮化物）洗涤离心细胞3次。
2. 离心的同时，融化Na^{125}I和乳糖过氧化物酶溶液。用冰预冷的乳糖过氧化物酶缓冲液按1∶1000的比例稀释30%的过氧化氢储存液。所有试剂和溶液均置于冰上。
3. 用1ml冰预冷的乳糖过氧化物酶缓冲液重新悬浮细胞。置于冰上。

4. 在通风橱中，将 20μl $Na^{125}I$ 加入到细胞中（2mCi/ml 细胞悬液），用吸管温和混匀。整个反应期细胞均置于冰上。
5. 将 100μl 乳糖过氧化物酶溶液加入细胞中，用吸管温和混匀。加入 25μl 稀释的过氧化氢酶溶液，用吸管温和混匀。冰上孵育 3min。
6. 50μl 乳糖过氧化物酶溶液加入细胞中，用吸管温和混匀。再加入 25μl 稀释的过氧化氢酶溶液，用吸管温和混匀。冰上孵育 3min。
7. 细胞中再加入 50μl 稀释的过氧化氢酶溶液，冰上孵育 3min。重复此步骤 3 次，每次加液后冰上孵育 3min。
8. 用 10ml 冰预冷的 10mmol/L 的 NaI（溶于 PBS 中）洗涤细胞，终止结合。
9. 用 10ml 10mmol/L 的 NaI（溶于 PBS 中）悬浮细胞，取 10μl 至计数瓶中，用 γ 计数器计算 γ 放射量。使细胞沉淀成团，处理和分析成团的细胞。

基本方案 2　去垢剂溶解的膜蛋白的碘化

材料

来源于 2×10^{8} 个细胞的去垢剂溶解的蛋白质 1ml（见支持方案 1 和 2）

50％悬液中的乳糖过氧化物酶珠子（Worthington Biochemical）

$Na^{125}I$（0.1mCi/μl；NEN Life Science Products，Amersham Pharmacia Biotech，或 ICN Biomedicals）

3％（w/v）右旋葡萄糖

含 0.02％（w/v）的 Triton X-100 裂解缓冲液（见配方）

PD-10 柱子（预装有 Sephadex G-25 树脂的 10ml 柱子；Amersham Pharmacia Biotech）

γ 计数器和合适的计数瓶

1. 在 1ml 来源于 2×10^{8} 个细胞的膜溶解的蛋白质中加入下列物质：

   20μl 50％悬液中的乳糖过氧化物酶珠子（或按照厂家说明）

   20μl $Na^{125}I$（2mCi）

   150μl 3％的右旋葡萄糖

   冰上孵育 30min，每 10min 混匀 1 次。
2. 用 10ml 含 0.02％的 TritonX-100 裂解缓冲液冲洗柱子 3 次，使其饱和。
3. 将标记管中的物质加入到柱子上，按每份 1ml 收集，直到液体流尽。加入 9ml 含 0.02％的 TritonX-100 裂解缓冲液，继续收集，直到收够 8 份。
4. 从每份中吸取 1～10μl 至计数瓶中，用 γ 计数器测量其放射活性。估计峰值的特异活性（cpm/mg 蛋白质）

   通常第 3、4 和 5 管中含有标记蛋白，第 7 和第 8 管不含 $Na^{125}I$。
5. 取适量液体至 15ml 圆锥形离心管中。

支持方案　通过均质化进行膜的制备

注意： 本方案所有步骤均应在4℃或冰上进行。

材料（带√项见附录1）

培养或来自解剖器官的细胞
√PBS，冰预冷
√Dounce 缓冲液
√10×磷酸酶抑制剂，可选择
√张力回复（tonicity restoration）缓冲液，冰预冷
√0.5mol/L EDTA，pH8.0
√TritonX-100 裂解缓冲液
相差显微镜
带研棒 B 的玻璃匀浆器（Dounce），冰预冷
10ml 圆锥形离心管，预冷
超高速离心器，BeckmanTLA100.3 转子或类似转子，超速离心管，4℃

1. 收集所需数量的细胞（如 2×10^8 个细胞），用冰预冷的 PBS 洗涤2次。
2. 细胞计数（单元1.1），用相差显微镜比较完整细胞与碎裂细胞。以 $1\times10^8\sim5\times10^8$ 个/ml 的浓度用 Dounce 缓冲液重新悬浮细胞，如果需要，加入1×磷酸酶抑制剂。在保持细胞核完整的情况下，使 Mg^{2+} 浓度尽可能低。冰上孵育细胞10～15min，不时转动离心管。
3. 将细胞转移至拧紧的玻璃匀浆器（Dounce）中，研棒 B 上下垂直研磨30～50次。
4. 加入冰预冷的张力回复（tonicity restoration）缓冲液，使终浓度为150mmol/L。确认细胞膜已破裂。
5. 将细胞转移至预冷的10ml 圆锥形离心管中，4℃，500*g* 离心5min，使细胞核沉淀。保存含有细胞膜的上清液，显微镜下检查细胞沉淀团，观察匀浆器匀浆的结果。
6. 上清液中加入0.5mol/L 的 EDTA，使终浓度为5mmol/L。上清液转移至超速离心管中，放入 BeckmanTLA100.3 转子或类似转子中，4℃，100 000 *g* 超速离心1h。将含有膜成分的细胞沉淀团转移至1.5ml 的微量离心管中。
7. 以相当于 2×10^8 个/ml 的细胞浓度，用 TritonX-100 裂解缓冲液重新悬浮含膜成分的沉淀物，4℃，频繁、温和地搅拌20～45min。4℃，12 000*g* 离心15min，以沉淀不可溶的物质。
8. 微量离心管中保存可溶的膜提取物。－70℃冻存。

基本方案3　乳糖过氧化物酶催化的可溶性蛋白的碘化

可溶性蛋白可以通过乳糖过氧化物酶催化或氯胺 T 的方法进行碘化。

材料（带√项见附录1）

10mg/ml 溶于 PBS 的 BSA

√PBS，冰预冷

30%（v/v）过氧化氢储存液

√0.025mol/L 的磷酸钠缓冲液，pH7.4，冰预冷

1mg/ml 溶于 PBS 的蛋白样品

$Na^{125}I$（0.1mCi/μl；NEN Life Science Products，Amersham Pharmacia Biotech，或 ICN Biomedicals）

1.5mg/ml 溶于 PBS 的乳糖过氧化物酶（Sigma 或 Calbiochem）（见配方），分装 −70℃储存，或新鲜配制

15mmol/L 溶于 PBS 的 NaI，新鲜配制，冰预冷

PD-10 柱子（预装有 Sephadex G-25 树脂的 10ml 柱子；Amersham Pharmacia Biotech）

γ 计数器和适当的计数瓶

1. 将 1ml 10mg/ml 溶于 PBS 的 BSA 加入 PD-10 柱子中（使柱子饱和），然后用 20～30ml 冰预冷的 PBS 洗涤柱子。
2. 用 0.025mol/L 的磷酸钠缓冲液以 1∶1000 的比例稀释 30%的过氧化氢储存液，至终浓度为 0.03%，用前新鲜稀释。
3. 在 10μl 1mg/ml 蛋白样品中，加入下列物质：

   0.5mCi $Na^{125}I$

   10μl 1.5mg/ml 的乳糖过氧化物酶

   2μl 0.03%的过氧化氢

   连续搅拌，室温孵育 1min。

   由于叠氮化物和含巯基的试剂可抑制乳糖过氧化物酶的活性，因此所要标记的样品应避免含有这些物质。
4. 每隔 1min，再次加入 2μl 0.03%的过氧化氢，共加 3 次。
5. 加入 0.5ml 15mmol/L 溶于 PBS 的 NaI 以终止反应。
6. 室温下，用一次性吸管将样品吸至 PD-1 柱子上（步骤 1），以每份 1ml 收集样品，直至液体流尽。加入 10ml PBS，继续以每份 1ml 收集样品。
7. 从每份样品中吸取 1～10μl 至计数瓶中，用 γ 计数器测量其放射活性。确定峰值的特异活性（cpm/mg 蛋白质）
8. 取适量液体至 15ml 圆锥形离心管中。

参考文献：Bailey，1994

撰稿人：Steve Caplan and Michal Baniyash

单元 8.5 免疫沉淀

警告：当使用放射活性物质时，应采取适当的预防措施以避免实验者和周围环境的污染。实验的实施和废物的处理应按照当地放射安全办公室提供的指导方法在适当的指定地点进行。

基本方案 1 应用非变性去垢剂裂解悬浮细胞的免疫沉淀

注意：所有溶液均应冷藏，所有步骤应于4℃或冰上进行。

材料（带√项见附录 1）

未标记或已标记的悬浮细胞

√PBS，冰预冷

√非变性裂解缓冲液，冰预冷

溶于 PBS 的 50%（v/v）蛋白 A-琼脂糖珠（或蛋白 G，见表 8.5.1：Sigma，Amersham Pharmacia Biotech），含有 0.1%的（w/v）BSA 和 0.01%（w/v）的叠氮化钠（NaN_3）

表 8.5.1 与蛋白 A 和蛋白 G[a,b,c]结合的抗体

抗体	结合蛋白 A	结合蛋白 G[d]	抗体	结合蛋白 A	结合蛋白 G[d]
单克隆抗体[e]			多克隆抗体		
人 IgG1	++	++	鸡	−	−
人 IgG2	++	++	驴	−	++
人 IgG3	−	++	山羊	+	++
人 IgG4	++	++	豚鼠	++	+
小鼠 IgG1	+	++	仓鼠	+	++
小鼠 IgG2a	++	++	人	++	++
小鼠 IgG2b	++	++	猴	++	++
小鼠 IgG3	++	++	小鼠	++	++
大鼠 IgG1	+	+	兔	++	++
大鼠 IgG2a	−	++	大鼠	+	+
大鼠 IgG2b	−	++	绵羊	+	++
大鼠 IgG2c	++	++			

a. ++，中等至强结合；+，弱结合；−，无结合。

b. 既有蛋白 A 特征又有蛋白 G 特征的混合蛋白 A/G 分子，联合为固相基质，Pierce 公司有售。

c. 来源于 Harlow 和 Lane（1988）以及 Pharmacia Biotech，Pierce 和 Jackson 免疫研究的相关信息。

d. 天然蛋白 G 可结合多种动物的白蛋白。蛋白 G 重组变异体可更好地结合大鼠、小鼠和豚鼠 IgG，而避免了与血清白蛋白的结合。

e. 蛋白 A 除了结合 IgG 外，还结合一些 IgM、IgA 和 IgE 抗体，而蛋白 G 仅结合 IgG。

特异性多克隆抗体（抗血清或亲和纯化的免疫球蛋白）或单克隆抗体（腹水、培养

上清或纯化的免疫球蛋白）

同型特异性对照抗体（例如，特异性多克隆抗体的免疫前血清或纯化的非相关免疫球蛋白；特异性单克隆抗体的非相关腹水、培养上清或纯化的免疫球蛋白）

√10%（w/v）BSA

√冲洗缓冲液，冰预冷

带固定角度转头的微量离心机（Eppendorf 5415C 或相当设备）

离心管转子（可以上下倒置）

1. 收集 0.5×10^7～2×10^7 个细胞于 15～50ml 带帽的圆锥形离心管中，4℃，400g 离心 5min。离心管置于冰上，用连接在真空阀门上的巴斯德吸管吸去上清。
2. 轻轻吹打管底使细胞悬浮。用与初始培养基同体积的冰预冷的 PBS 冲洗细胞 2 次，步骤同 1。
3. 每 0.5×10^7～2×10^7 个细胞加入 1ml 冰预冷的非变性裂解缓冲液，用漩涡搅拌器以适当速度温和搅拌 3s。冰上放置 15～30min，转移至 1.5ml 圆锥形微量离心管中。
4. 4℃，16 000g（最大速度）微量离心 15min 清除溶解产物。用可加一次性吸头的可调移液器将上清转移至新的微量离心管中。原离心管中留下 20～40μl 上清液，避免破坏沉淀的细胞团。在预清除（步骤 10）或加抗体珠前，将清除的溶解产物置于冰上。
5. 在 1.5ml 的圆锥形微量离心管中加入 30μl 蛋白 A-琼脂糖珠、0.5ml 冰预冷的 PBS 以及下列特异性抗体（选择一种）：

   1～5μl 多克隆抗血清

   1μl 亲和纯化的多克隆抗体

   0.2～1μl 含多克隆抗体的腹水

   1μl 纯化的单克隆抗体

   20～100μl 含单克隆抗体的杂交瘤细胞培养上清液

   如果抗体为不结合蛋白 A 的一个种族或亚类，则用蛋白 G 代替蛋白 A（见表 8.5.1）。
6. 将 30μl 50%的蛋白 A-琼脂糖珠、0.5ml 冰预冷的 PBS 和下列合适的对照抗体（选择一种）在 1.5ml 圆锥形微量离心管中共同孵育，建立非特异性的免疫沉淀对照：

   1～5μl 免疫前血清，作为多克隆抗血清的对照

   1μg 纯化的非相关多克隆抗体（抗细胞裂解液中不存在的抗原决定簇的抗体），作为纯化多克隆抗体的对照

   0.2～1μl 含非相关单克隆抗体的腹水（抗细胞裂解液中不存在的抗原决定簇的抗体，同种族抗体，以及特异抗体的免疫球蛋白亚类），作为含多克隆抗体的腹水的对照

   1μg 纯化的非相关单克隆抗体，作为纯化单克隆抗体的对照

   20～100μl 含非相关单克隆抗体的融合细胞培养上清液，作为含特异单克隆抗体的融合细胞培养上清液的对照。
7. 完全混匀悬液。4℃，上下振荡离心管转子中孵育的混合物，1h 以上。

8. 4℃，16 000g（最大速度）微量离心 2s。用连接于真空抽吸装置的带合适大小吸头的 Pasteur 移液器吸去上清（含有未结合的抗体）。加入 1ml 非变性裂解缓冲液，颠倒离心管 3 或 4 次，使珠子重新悬浮。
9. 重复步骤 8，清洗，微量离心样品，再次吸去上清。
10. 在微量离心管中，加入 1ml 细胞裂解液（步骤 4 得到的）和 30μl 50%的蛋白 A-琼脂糖珠。4℃，于离心管转子中上下振荡 30min。4℃，16 000 g（最大速度）微量离心 5min。
11. 10μl 10%的 BSA 加入到含有结合蛋白 A-琼脂糖珠的特异抗体的离心管中（步骤 9），并将所有的清除裂解液（来自步骤 4 或 10）加入到此管中。如果要进行非特异免疫沉淀对照，则将裂解液分成两份，每份 0.4ml，一份用来加入特异性抗体，另一份进行非特异性对照。于离心管转子中上下振荡混匀，4℃，孵育 1～2h。
12. 4℃，16 000g（最大速度）微量离心 5min。用连接于真空抽吸装置的带合适大小吸头的 Pasteur 移液器吸去上清（含有未结合的抗体）。
13. 加入 1ml 冰预冷的冲洗缓冲液，盖上管子，上下颠倒 3 或 4 次重新悬浮珠子。4℃，16 000g（最大速度）微量离心 5min。吸去上清，留下 20μl 上清。30min 内洗涤 3 次以上。
14. 1ml 冰预冷的 PBS 再次洗涤珠子。用长型巴斯德移液器完全吸去上清。立即处理或 −20℃保存。

见表 8.5.2 问题解决指南。

表 8.5.2 免疫沉淀问题指南

问题	原因	解决方法
缺乏特异性放射性标记的抗原带		
延长放射自显影时间后凝胶完全空白	细胞未标记好：放射标记前体太少，标记细胞太少，标记过程中细胞裂解或丢失，标记混合物中冷氨基酸太多，标记温度错误	通过 TCA 沉淀检查标记的结合量（单元 8.1）；检查标记过程
仅有非特异性条带	抗原不含有用于标记的氨基酸	用其他放射性标记氨基酸标记细胞，或用含氚的糖标记糖蛋白
	抗原表达水平非常低	改换已知能高表达抗原的细胞，通过其他方法检测；转染高表达的细胞
	蛋白质变化率高，不能通过长期标记法进行有效标记	应用脉冲标记
	蛋白质变化率低，不能通过短期标记进行有效标记	应用长期标记
	蛋白质无法用溶解细胞的裂解缓冲液抽提	改用不同的非变性去垢剂或在变性条件下溶解
	抗原无法用 TritonX-100 在 4℃下抽提	37℃下 TritonX-100 抽提，或使用其他去垢剂
	抗体不沉淀	鉴定和应用能沉淀抗原的抗体
	天然抗原的抗原决定簇未暴露	变性条件下抽提细胞
	抗体不识别变性的抗原	非变性条件下抽提细胞
	抗体不结合免疫吸附剂	改用不同的免疫吸附剂（表 8.5.1）；使用中间抗体
	抗原在免疫沉淀过程中降解	确保所用蛋白酶抑制剂新鲜

续表

问题	原因	解决方法
高背景的非特异性条带		
凝胶分离带背景高	不溶于去垢剂的蛋白质残留物	离心后立即去上清，细胞团上部保留少量上清。如果细胞再次悬浮，则再次离心
所有条带背景都很高	清洗不完全	清洗过程中，盖上管帽颠倒几次
	蛋白标记不良	优化标记过程，使信噪比达到最大
	不溶于去垢剂的蛋白质去除不完全	100 000g 离心裂解液 1h
	未标记蛋白不足以抵抗非特异性的结合	增加 BSA 的浓度
	抗体含有聚合体	结合珠子前以最大速度微量离心抗体 15min
	抗体溶液含有非特异性抗体	用亲和法纯化抗体；用不表达抗原的培养细胞的丙酮抽提物吸收抗体；对于酵母细胞，用非突变细胞吸收抗体
	抗体太多	减少抗体用量
	预清除不完全	应用同种族的非相关抗体和结合免疫吸附剂的免疫球蛋白亚类进行预清除
	免疫沉淀的蛋白质不特异	免疫沉淀前分级分离细胞溶解产物（例如，硫酸铵沉淀、血凝素吸收或凝胶过滤）；冲洗缓冲液清洗后，用含 0.1%SDS 的冲洗缓冲液或 0.1% SDS/0.1% 脱氧胆酸钠清洗珠子
用免疫印迹法检测出免疫沉淀的抗体		
免疫印迹中可见完全的免疫球蛋白或重链和（或）轻链	蛋白 A 发生变化或二抗识别免疫沉淀的抗体	使用可共价结合免疫沉淀固体相基质的抗体；使用来自不同种族的一抗和特异的抗免疫印迹一抗的合适的二抗来探测印迹

备择方案 1　非变性去垢剂溶液裂解贴壁细胞的免疫沉淀

注意：所有溶液都应冷藏，所有步骤应于 4℃或冰上进行。

附加材料（同见基本方案 1）

组织培养板中单层生长的未标记或标记的细胞

1. 用冷预冷的 PBS 清洗贴壁在组织培养板上的细胞 2 次。用连接在真空阀门上的巴斯德吸管吸去 PBS。

   警告：按照现行安全规则去除放射活性物质。

2. 组织培养板置于冰上。加入冰预冷的非变性裂解缓冲液（每 100mm 培养面积加 1ml，约 $0.5\times10^7\sim2\times10^7$ 个细胞）。
3. 用橡皮细胞刮从培养板上刮取细胞，用带有一次性枪头的可调移液器将悬液转移至 1.5ml 圆锥形微量离心管中。温和混匀 3s，冰上放置 15～30min。
4. 清除裂解液，进行免疫沉淀（见基本方案 1，步骤 4～14）。

备择方案 2　变性条件下去垢剂裂解细胞进行的免疫沉淀

如果原有蛋白质的抗原决定簇不能与抗体结合，或者如果抗原无法用非离子去垢剂从细胞中抽提出来，应在变性条件下溶解细胞。

附加材料（同见基本方案 1；带√项见附录 1）

√变性裂解缓冲液
加热板设置于 95℃（Eppendorf Thermomixer 5436 或相当设备）
带有 25G 针头的 1ml 注射器

1. 收集培养悬液中的细胞（见基本方案 1，步骤 1～2），置于冰上。大约每 0.5×10^7～2×10^7 个细胞沉淀中加入 100μl 变性裂解缓冲液。以最大速度剧烈搅拌 2～3s 重新悬浮细胞。悬液转移至 1.5ml 圆锥形微量离心管中。于加热装置中 95℃加热样品 5min。
2. 用 0.9ml 非变性裂解缓冲液稀释悬液，温和混匀。
3. 用带有 25G 针头的 1ml 注射器吹打悬液 5～10 次（或直到黏度下降），使 DNA 断裂。冰上孵育 5min。
4. 清除裂解液，进行免疫沉淀（见基本方案 1，步骤 4～14）。

备择方案 3　非去垢剂裂解的细胞免疫沉淀

细胞内已溶解蛋白质（如胞质体或细胞器腔内蛋白质）的免疫沉淀无需应用去垢剂。

附加材料（同见基本方案 1；带√项见附录 1）

√不含去垢剂的裂解缓冲液
带有 25G 针头的 3ml 注射器

1. 收集并清洗悬液中的细胞（见基本方案 1，步骤 1～2）。大约每 0.5×10^7～2×10^7 个细胞沉淀中加入 1ml 冰预冷的不含去垢剂的裂解缓冲液。以适宜速度用搅拌子温和搅拌 3s，重新悬浮细胞。
2. 用带有 25G 针头的 3ml 注射器吹打悬液 20～30 次，直到 90%以上细胞破碎。
3. 清除裂解液，进行免疫沉淀（见基本方案 1，步骤 4～14）。

基本方案 2　免疫沉淀-回收

一旦抗原通过免疫沉淀被分离开，可以从珠子中将其分离，用与第一次免疫沉淀使用的相同抗体或不同抗体重新免疫沉淀（“再回收”）。

材料（带√项见附录 1）

√洗脱缓冲液
已结合抗原的珠子（见基本方案 1，步骤 14）
√10%（w/v）BSA
√非变性裂解缓冲液
加热板设置于 95℃（Eppendorf Thermomixer 5436 或相当设备）

1. 15μl 已结合抗原的珠子中加入 50μl 洗脱缓冲液，振摇混匀。室温孵育 5min；95℃，加热装置中孵育 5min；室温冷却。
2. 加入 10μl 10%的 BSA，轻摇混匀。
3. 加入 1ml 非变性裂解缓冲液，室温孵育 10min。
4. 去除裂解液，进行第二次免疫沉淀（见基本方案 1，步骤 4～14）。

参考文献：Harlow and Lane，1988；Springer，1996
撰稿人：Juan S. Bonifacino and Esteban C. Dell'Angelica

单元 8.6 酵母蛋白的代谢标记和免疫沉淀

酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）一直是研究基本细胞过程的重要模式系统。脉冲标记新合成的蛋白质以及通过免疫沉淀（单元 8.5）和 SDS-PAGE（单元 7.1）在追踪阶段追踪蛋白质去向的能力是许多研究的重要一环。由于酵母可以吸收无机硫酸盐，使之结合到甲硫氨酸和半胱氨酸上，因此可以用$^{35}SO_4^{2-}$标记酵母细胞。但大多数研究者为达到此目的，常使用^{35}S 甲硫氨酸和^{35}S 半胱氨酸的混合物，它们可以更直接地进入细胞内，连接在带电荷的氨酰 t-RNA 上。标记有$^{35}SO_4^{2-}$的 *E. coli* 细胞水解产物，商品名为 TRAN^{35}S-LABEL（ICN）或 EXPRE^{35}S^{35}S（NEN），是代谢性标记酵母蛋白的^{35}S 氨基酸的来源。

警告：当使用放射活性物质时，应采取适当的预防措施以避免实验者和周围环境的污染。实验的实施和废物的处理应按照当地放射安全办公室提供的指导方法在适当的指定地点进行（同见单元 8.1）。

基本方案 酵母蛋白的标记和免疫沉淀

材料（带√项见附录 1）

酵母
含有 2%（w/v）葡萄糖（SD 培养基）不含琼脂的基本培养基
无甲硫氨酸的 SD 培养基（单元 1.6）
^{35}S 蛋白水解产物标记混合物（>1000Ci/mmol）

√50×追踪溶液

50%（w/v）三氯乙酸（TCA）

丙酮，冰预冷

√SDS/尿素缓冲液

√去垢剂 IP 缓冲液

感兴趣蛋白质的特异性抗体

用作阴性对照的免疫前血清

√蛋白 A-琼脂糖凝胶

√去垢剂/尿素缓冲液

50mmol/L Tris·Cl（pH7.5）/1%（w/v）SDS

√1×（w/v）SDS 上样缓冲液

125ml 培养瓶

1.7ml 一次性离心管

0.1～0.25mm 玻璃珠（Glen Mills）

即用纸套（Ready-Caps）和小瓶（Beckman）

SpeedVac 蒸发器

1. 从培养皿中挑取单个酵母菌落至含 2.5ml SD 培养基的 125ml 的培养瓶中。加入合适的培养基添加物，以维持携带有营养缺陷型突变株的生长，或保持任一质粒的选择。30℃温床剧烈振摇（250r/min）过夜。
2. 过夜培养菌液以 1：4 或 1：10 稀释（水）后，用分光光度计测量 OD_{600} 值。对于大多数株系，1OD_{600} 相当于每毫升约含 1×10^7 个细胞。
3. 如果过夜培养菌仍处于对数生长期（OD_{600} 不超过 1.0），则进行步骤 5，以获得足够的细胞进行标记。

   脉冲-追踪实验所需的细胞数依赖于感兴趣蛋白质的表达水平，需根据经验确定。然而，典型的脉冲-追踪实验共需 8OD_{600} 的细胞，每四个时间点需要 2OD_{600} 的细胞。
4. 过夜培养菌每毫升超过 1OD_{600} 者，用同一培养基（25～50ml）稀释至 0.25OD_{600}，如上所述继续培养 4～5h。
5. 测量和记录培养菌的 OD_{600}，5000*g* 离心 5min 使酵母菌沉淀成团。弃去用过的培养基，以 SD 培养基（不含甲硫氨酸）重新悬浮细胞，至终浓度为每毫升 5OD_{600}。
6. 确定实验所需的细胞数量，吸取合适的培养液至一次性离心管（如 Falcon2059 或 2070）中。
7. 适宜温度下（通常 30℃）剧烈振摇（250r/min）预孵育细胞。加入 ^{35}S 甲硫氨酸和半胱氨酸至终浓度 125μCi/ml（如果所用细胞浓度不同，用 25μCi/OD_{600}）开始标记。孵育 5～15min。
8. 加入 50×追踪溶液至终浓度为 1×，开始追踪。在预期的追踪时间点（如 0、5、15 和 45min），从培养菌中取等份的液体至放置于冰上、已做好标记的微量离心管中，管中预先加入 0.25 体积 50%（w/v）TCA（TCA 终浓度为 10%）以终止追踪。

   警告：TCA 具强腐蚀性。制备和应用 TCA 溶液时应注意保护眼睛，避免接触皮肤。

9. TCA 处理至少 15min 后，以最大速度在微量离心管中离心 10min 使成细胞团。上清吸至放射活性废物罐中，以大约 1.0ml 冰预冷的丙酮清洗细胞。以最大速度微量离心 4min，丙酮上清吸至放射活性废物罐中。再用丙酮重复清洗一次。

警告：上清和废物应作为混合化学或放射性废物处理；按现行安全规则处理。

10. 经丙酮洗涤的 TCA 细胞团在 SpeedVac 蒸发器中蒸干，然后加入 100μl SDS/尿素缓冲液，室温放置至少 15min。
11. 加入玻璃珠（0.1～0.25mm）至 80%～90%（v/v）的样品体积中，搅拌 1min。95℃加热 4min，再搅拌 15～30s。加入 900μl 去垢剂 IP 缓冲液，搅拌，冰上放置 10min 以上。
12. 以最大速度微量离心样品 15min，小心吸取 0.8ml 上清（裂解液）至新的离心管中，避免碰到玻璃珠或任何沉淀在玻璃珠上端未溶解的物质上。
13. 为确定蛋白质结合 ^{35}S 的量，每个上清样品中取 5μl 至 Beckman Ready-Cap 中，将 caps 转移至计数瓶中，用闪烁计数器测量放射活性。
14. 上清液中加入抗血清（每 OD 标记细胞通常 1～2μl）和 75～100μl 蛋白 A-琼脂糖凝胶悬液。将管子置于架上，侧放架子，低温下摇动样品 4h 或过夜。充分振摇使蛋白 A-琼脂糖凝胶处于悬液中。
15. 3000g 微量离心 30s 沉淀免疫混合物，将上清转移至新的离心管中。由于通常可能会对这些裂解液中的第二种蛋白质进行免疫沉淀，故保存上清。
16. 用 1ml 去垢剂/尿素缓冲液清洗细胞团 2 次，去垢剂 IP 缓冲液清洗一次。每次清洗的上清吸至放射活性废物罐中。
17. 供选择：用二抗免疫沉淀裂解液，加入 75μl 蛋白 A-琼脂糖凝胶，低温下如上摇动样品 2h，清除任何残留的抗原-抗体复合物。最大速度微量离心 10min，上清转移至新的离心管中。用二抗对清除的裂解液进行免疫沉淀。
18. 以 100μl 50mmol/L Tris·Cl（pH7.5）/1%（w/v）SDS 重新悬浮细胞，95℃加热 4min。重复加入去垢剂 IP 缓冲液（步骤 11）和步骤 12～16，跳过步骤 13。最终得到的细胞团于真空下干燥 5～10min。
19. 以 50μl 1×SDS 上样缓冲液重新悬浮细胞团，95℃加热 4min。一半样品进行 SDS-PAGE（单元 7.1）。保存剩余样品（4℃），以备重新电泳。电泳胶进行荧光照相或磷光显影（单元 7.8）。

备择方案　制备酵母原生质体

附加材料（同见基本方案；带√项见附录 1）

放射性标记的酵母细胞（参见基本方案，步骤 1～7）

√2×原生质/终止溶液

无脂肪酸的牛血清白蛋白（BSA），组分Ⅴ

10mg/ml 细胞壁溶解酶（zymolyase）100T（Seikagako Kogyo），溶菌酶（Enzogenetics）或酵母细胞溶解酶（ICN）

1. 培养和标记酵母细胞。追踪细胞，以 1 体积的 2×原生质/终止溶液代替 50%（w/v）TCA（参见基本方案，步骤 8）。如果分泌蛋白可被 TCA 从原生质周边区域组分沉淀，加入 BSA 至 1mg/ml 作为载体。样品置于冰上，直至收集完所有追踪时间点的样品。
2. 每个样品每 OD_{600} 的细胞加入 2μl 10mg/ml 细胞壁溶解酶 100T（ICN），温和搅拌 30℃孵育 30min。5000g 微量离心 5min，使细胞沉淀，上清转移至新的离心管中。
3. 为监测酵母菌原生质体化反应，未标记细胞溶解于 1×原生质/终止溶液中，使每毫升悬液为 $10OD_{600}$，吸取 200μl 作对照，将样品等分，每管中加入细胞壁溶解酶。30℃孵育 30min，每管吸取 25μl 用水稀释至 1ml，读取 OD_{600} 值。如果处理样品的读数≥未处理样品的 10%，则样品再加入细胞壁溶解酶，继续孵育。

4a. 对于免疫沉淀后的 TCA 沉淀：上清中加入 0.25 体积 50%的 TCA，细胞团中加入 0.5ml 10%（w/v）的 TCA，沉淀蛋白质。继续进行至基本方案的步骤 9。

4b. 对于无 TCA 沉淀的免疫沉淀：用 100μl SDS-尿素缓冲液溶解细胞，95℃加热 4min 裂解细胞，不进行 TCA 沉淀和玻璃珠裂解步骤。加入 900μl 去垢剂 IP 缓冲液，搅拌，样品置于冰上放置 10min 以上。

4c. 对于天然免疫沉淀：以 1ml 非变性裂解缓冲液重新悬浮细胞（单元 8.5）。如单元 8.5 所述，对裂解液进行天然免疫沉淀。

4d. 对于亚细胞分级分离：通过将细胞团重悬于低渗透性缓冲液（例如，25mmol/L Tris·Cl，pH7.2/0.1mol/L 山梨糖醇）中裂解原生质，将不同细胞器组分进行富集（单元 3.9）。

参考文献：Marzluf，1997

撰稿人：Todd R. Graham

（朱自强　刘　伟译）

第 9 章　蛋白质的磷酸化作用

细胞利用蛋白质的选择性磷酸化作用来调整细胞内诸多的生理加工过程。在靶蛋白的特定氨基酸序列模体上，蛋白激酶可将磷酸基偶联在酪氨酸、丝氨酸或苏氨酸的残基上。该过程又可通过蛋白质磷酸酯酶逆转。蛋白激酶和蛋白磷酸酶可识别特定的模体和特定的蛋白质从而决定了其功能的特异性。大约 10%或更多的蛋白质的磷酸化受到位点特异性调控细胞的调控可以开启或调整许多重要的信号和新陈代谢途径，以及调节诸如细胞迁移和胚胎发育等生物学行为。由于细胞有一千多种不同的蛋白激酶，因此不难理解磷酸化作用对细胞生物调控的重要性。

一种蛋白质磷酸化作用可以调控酶，可通过增加或减少关键磷酸基来激活或抑制酶的活性；另一种蛋白质磷酸化作用则可以使两种蛋白质结合形成复合物，如通过 SH_2 结构域与靶蛋白特定的酪氨酸磷酸化位点偶联形成复合物。其他常用的策略是激活单传导途径的蛋白磷酸化级联反应。例如，导致生成多种类型 MAP 激酶的蛋白质级联磷酸化作用，其复杂线性和相互作用的途径是细胞的生长、分化及基因的表达的重要调控因素。在单元 9.3 中有关于 MAP 激酶的具体阐述。

尽管鉴定磷酸化作用的经典方法为掺入放射性的无机 ^{32}P（单元 9.1），但是最近一个对于细胞生物学家有着特殊意义的方法学的突破是使用效力更强的非放射性方法来研究蛋白质的磷酸化作用。通过免疫印迹、免疫荧光和免疫组织学方法使得非专业研究者也有可能研究细胞和组织的复杂的信号转导功能。这些新方法是基于特异性抗体具有选择性地识别一种或多种氨基酸上的某磷酸基团，例如，蛋白质上磷酸化的苏氨酸残基或者特定蛋白质所含有的如活化的 MAP 激酶等一类磷酸键。由于已经商业化，人们可广泛选用它们作为免疫工具。单元 9.2 提供了一些通过使用特定抗体来快速直接地鉴定磷酸化蛋白质的方法。如果没有针对某蛋白质的强特异性的抗体，按照抗磷酸化苏氨酸的免疫检测，本单元也能提供一种可通过抗原抗体反应产生的免疫沉淀物的间接方法。本单元还提供了一些针对重要磷酸化调控分子的抗体定位的检测方法。这种方法使得研究者可探索细胞内关键磷酸化蛋白的运动或表达模式，甚至在完整机体的组织也是可能实现的。

MAP 信号传导是许多关键细胞生物学调控事件的核心。同时，单元 9.3 对这一种重要信号过程提供了定量描述的方法。由于通过 MAP 激酶所产生的信号极为复杂，因此需要特异性抗体来分离每一个磷酸化的蛋白质，并且通过检测 ^{32}P 的掺入数量来对磷酸化作用进行测定。因为一些激酶也许与某一特定细胞生物学控制事件有关，因此单元 9.3 提出使用某种凝胶激酶实验的方法来检测一些未知的激酶。把检测底物加到 SDS-PAGE 中，并用电泳分离粗制的蛋白质抽提物来评价在体外酶产生磷酸化作用的能力。

撰稿人：Kenneth M. Yamada

单元9.1　用^{32}P标记培养细胞和制备用于免疫沉淀的细胞裂解物

本单元阐述的^{32}P标记和培养的昆虫、鸟类或者哺乳动物细胞的细胞裂解产物，用于随后实验的蛋白免疫沉淀反应，^{32}P也适用于标记任何细胞成分。

警告： 未经防护的^{32}P可渗透到皮下1cm，因此要防护裸露的皮肤和眼睛。当处理大量的^{32}P时，应该戴手套和眼罩；当处理含有^{32}P的样品时，应该使用2.5cm厚的树脂玻璃防护罩，此防护罩应该足够大，无论观察者坐着或站着做实验时均能得到保护。

注意： 所有与活细胞接触的溶液或器械都必须无菌。合理应用无菌术，除非具体说明，否则所有的培养容器均需放置在湿润的37℃、含有5%CO_2的培养箱中。某些介质（如DMEM）需要改变CO_2浓度使pH维持在7.4。

基本方案　用^{32}P标记的培养细胞和使用温和的去垢剂裂解细胞

材料（带√项见附录1）

待标记的细胞

√标记培养基，37℃：添加正常浓度血清或无磷酸盐溶液透析血清的无磷酸盐组织培养基（如DMEM）

含500mCi/ml～1Ci/ml carrier-free $H_3{}^{32}PO_4$的HCl（ICN）

√Tris缓冲液（TBS）或Dulbecco's磷酸缓冲液（DPBS），冰冷

√温和细胞裂解缓冲液（用于维持酶活性或蛋白复合结构）或放射性免疫沉淀反应细胞裂解缓冲液（用于非特异污染所造成的低背景）

固定的金黄色葡萄球菌（Pansorbin，Calbiochem；可选）

加滤芯的耐气溶胶吸头

树脂玻璃盒，37℃

加滤芯的一次性移液管或一次性移液器

旋盖微量离心管

带SM24转子和树胶套或类似物的高速低温离心机，4℃

1. 在最佳时期标记培养细胞（对于贴壁细胞是处于亚汇合时，对于非贴壁细胞也应小于其最大密度）。

2a. 贴壁细胞：吸去生长培养基，通过如下方法洗去残留的含磷培养基。37℃下，每35mm培养皿加入0.5～1ml标记培养基，每50mm培养皿加入1～2ml标记培养基，每100mm的贴壁细胞培养皿加入2～4ml标记培养基。如果需要则可吸去标记培养基洗液。

2b. 非贴壁细胞：在室温下以1800g离心1min，温和离心培养物，用吸管吸去培养基，用标记的培养基重悬细胞，再离心除去培养基。每10^7个细胞中加2ml培养基并且转移至一个大小合适的培养皿中。

3. 在树脂玻璃防护屏后工作，用带有滤芯的耐气溶胶微量移液器加入^{32}P至最终浓度为0.1～2mCi/ml（使用组织培养超净台，随后培养基无需灭菌处理）。
4. 把培养皿放入预温的树脂盒内，然后将其放入培养箱 1～2h，细胞在 2mCi/ml 的浓度下可以耐受，而在更低浓度（0.1～0.5mCi/ml）可耐受 8h。在标记阶段结束后，把标记的细胞连同树脂盒一起放入冷室，仍把细胞放在树脂防护屏后。

对于贴壁细胞

5a. 从盒子中取出培养皿，人工除去标记的培养基，可使用一次性加滤芯的移液吸管，或者使用一次性塑料巴氏移液管（不要使用真空吸液器）。移出的培养基及吸管作为放射性废物处理丢掉。用 2～10ml 冰冷的 TBS 洗一遍细胞，人工除去洗涤缓冲液，将其作为放射性废物处理掉。被标记的细胞继续放在树脂防护罩后面。

6a. 将细胞裂解缓冲液加入细胞中，加法如下：每 35mm 培养皿加入 0.3ml 缓冲液，每 50mm 加入 0.6ml 缓冲液，每 100mm 加入 1.0ml 缓冲液。用橡胶刮刀刮下贴壁细胞，把贴壁细胞的裂解物保留在培养皿中放置于 4℃孵育 20min，再用橡皮刮刀将贴壁细胞的裂解物刮到培养皿的另一边，然后将裂解物移入一旋盖微量离心管内。

对于非贴壁细胞

5b. 从盒子取出培养皿，把细胞转移到一个旋盖微量离心管中，经离心（1800g，1min）使细胞成团，除去培养基（不要使用真空吸液器），用小体积的冰冷的 TBS 温和地重悬细胞，然后将其移入一旋盖微量离心管中，离心 1800g，1min。继续将细胞及裂解物置于树脂防护罩后。

6b. 每 10^7 个细胞中加入 0.5～1ml 细胞裂解缓冲液，然后使用一次性的塑料巴氏吸管温和地吹动使细胞团块悬浮，4℃，孵育 20min。

7. 盖上半满的离心管，在 4℃离心 30min，转速 26 000g，使裂解物澄清。不要在低温环境下使用未冷却的微型离心机。如果裂解物不清澈，延长离心时间至 90min 或在离心前向裂解物中加入 50μl 经固定的金黄色葡萄球菌的 RIPA 缓冲液。
8. 离心之后，将上清（溶解物）移入一个新管，弃去含有放射活性沉淀物的离心管。如果必要的话，可用抽吸器将黏性的沉淀物移入放射性废物的容器，从而可以得到所有的上清。分析标记裂解物可以使用凝胶电泳（单元 7.1）、免疫沉淀（单元 8.5）或者蛋白质纯化技术。所有分析放射性物质的操作步骤应在 4℃进行，并且使用适当防护物。

备择方案　在 SDS 中煮沸裂解细胞

某些蛋白质使用温和的或 RIPA 的细胞裂解缓冲液很难溶解，并且在某些分析过程中使用的一些抗体仅仅可以识别在蛋白质变性时暴露的抗原表位。

在这些情况下，用 SDS 完全裂解标记细胞是非常有利的，然后调整细胞裂解缓冲液成分，使之与用于免疫沉淀反应中的 RIPA 缓冲液的成分相匹配。

附加材料（同见基本方案；带√项见附录1）

√SDS裂解缓冲液
√RIPA校正缓冲液
√免疫沉淀物洗涤缓冲液

1a. 对于贴壁细胞：标记和洗涤细胞（见基本方案，步骤1～5a）按照如下规则加SDS细胞裂解缓冲液，在35mm培养皿中加入0.1ml，50mm培养皿中加入0.25ml，100mm培养皿中加入0.5ml。加入后立即使用橡胶刮刀刮培养皿，然后将细胞裂解产物转入一旋盖微量离心管。
1b. 对于非贴壁细胞：标记和洗涤细胞（见基本方案，步骤1～5b）。短时涡旋细胞从而使细胞团块松散，然后每5×10^7个细胞中加入1ml SDS，再次涡旋。
2. 煮沸样品2～5min，然后加入4倍体积的RIPA校正缓冲液并充分混合，通过如下离心使细胞裂解液澄清：4℃，2600g离心90min，4℃以最大速度微量离心（使用预冷的微量离心管），或者如果必要的话，加入50μl固定的金黄色葡萄球菌并且在4℃以2600g离心30min。使用免疫沉淀洗涤缓冲液作为洗涤液进行洗涤（单元8.5）。

参考文献：Sefton et al.，1980
撰稿人：Bartholomew M. Sefton

单元9.2　磷酸化的免疫检测

本单元描述的方案是应用特异性的抗磷酸化氨基酸（PAA）和抗磷酸化蛋白抗体检测蛋白磷酸化作用和蛋白激酶活性。

注意：与活体细胞接触的溶液和器械都必须无菌，合理应用无菌技术。除非特殊说明，所有的组织培养物必须在37℃湿润的、含5%～10%CO_2的条件下进行实验。某些培养基（如DMEM）需要改变CO_2的浓度使pH保持在7.4。

基本方案1　应用免疫印迹技术对蛋白质磷酸化的免疫测定

材料（带√项见附录1）

6cm大小的装有Rat1细胞的培养皿或相当物（例如，大多数的组织培养细胞系、均一的动物组织、完整的低等生物）。
√DMEM/10%FBS（加热灭活的）
血清饥饿培养基：DMEM/0.1%FBS
含有50μg/ml EGF的EGF缓冲液
表皮生长因子（EGF）缓冲液：磷酸盐缓冲液（PBS）/0.5mg/ml小牛血清白蛋白（BSA，结晶）

过氧钒酸盐（供选择）：0.1mmol/L 钒酸盐/0.2mmol/L 双氧水

√冰冷的 PBS

√冰冷的匀浆缓冲液

√冰冷的细胞裂解缓冲液：匀浆缓冲液/1%Triton X-100 或相当的去垢剂（如 NP-40）

√RIPA（供选择）缓冲液

√冰冷的激酶缓冲液

考马斯蛋白测定试剂（Pierce）

蛋白标准：分别含有 5、10、20、50、100 和 200μg/ml BSA 的均浆缓冲液/0.03%（v/v）Triton X-100

√4×SDS-PAGE 上样缓冲液

预染蛋白标记物（16～200kDa）

转移缓冲液：50mmol/L Tris-Cl（pH8.8）/50mmol/L 甘氨酸

封闭液：TBST/2%BSA

√Tris-盐水缓冲液/Tween20（TBST）

一抗：例如，单克隆抗活性的 MAP 激酶抗体和多克隆抗一般 MAP 激酶抗体（大多数特异性抗 PAA 抗体或抗磷酸化蛋白的抗体均可应用）

二抗：辣根过氧化物酶（HRP）偶联羊抗兔抗体和碱性磷酸酶（AP）偶联羊抗鼠抗体

AP 检测系统（如 Promega）

√增强的化学发光系统（ECL）

超声裂解仪（可选）

预冷至 4℃的 1ml 的吸头

预冷至 4℃的 1.5ml 离心管（4 套，每套 6 支，6 支管分别标记 1～6）

96 孔微量滴定板

酶标仪，波长 595nm

乙酸纤维素薄膜（与凝胶尺寸相匹配）

电印迹转移仪（如 Bio-Rad）

两张 3MM Whatman 滤纸（与凝胶尺寸相匹配）

1. 用 DMEM/10%FBS 培养基培养 6 个 6cm 培养皿的 Rat1 细胞，当细胞长至亚汇合（约 0.5×10^6 个/培养皿）时，弃培养基，向每个培养皿中加入 2ml 血清饥饿培养基。注意使培养基覆盖每个培养皿的底部并且保持底部平坦。继续培养 18h。
2. 向其中三个培养皿中加入 2.5μl EGF，EGF 浓度为 50μl/ml（刺激生长），向另三个培养皿中加入 2.5μl EGF 缓冲液（对照组）。缓冲液先加入需培养最长时间的培养皿，然后间隔适当的时间再加入培养时间次长的培养皿。也可以使用一个时间表来确定加入刺激物的合适的时间，同时很快地收集细胞（5～10min）。如不清楚刺激因素对特定细胞的影响，则设一个阳性对照，如过氧钒酸盐。将培养皿放回培养箱，培养 5min、15min 及 45min。
3. 培养结束后，把培养皿放在冰上弃去培养基。用 5ml 冰冷的 PBS 洗涤两遍。用 5ml 冰冷的匀浆缓冲液洗涤一次（洗涤时间 0.5～1.5min/培养皿）。

4. 向每个培养皿中加入 350μl 冰冷的细胞裂解缓冲液，轻轻地倾斜培养皿（在冰袋上操作），然后用一个塑料刮刀或橡皮刮刀将细胞刮入缓冲液中，也可以用去垢剂混合物（如 RIPA 缓冲液）使细胞更彻底地裂解；或者使用超声裂解细胞的方法：用两个 7s 50W 脉冲（作用一个 5ml 样品）从细胞质和细胞核碎片中提取蛋白质，而不是从细胞膜中提取。使用预冷的 1ml 吸头（对于贴壁样品可以将尖端剪短），将细胞及其缓冲液转移至预先标记并预冷的 1.5ml 离心管中。在冰上继续裂解细胞 10min。

   在细胞提取过程中，不提倡向细胞萃取液中加入热的 SDS-PAGE 上样缓冲液。因为这样会使细胞释放染色质，从而在凝胶中很难处理。提取时也不提倡冻融方法，因为在融化时，分子会发生衰变。

5. 在 4℃以 15 000g 微型离心机离心细胞抽提物 15min，然后将上清转移至预冷的标记好的新离心管。从每份细胞抽提物中吸取 5～10μl 分别加入已标记好的微量离心管，测定蛋白质的浓度（需要对照物，细胞数不必精确）。将余下的细胞抽提物放入冰盒中储存。向每个 5μl 的细胞抽提物中加入 145μl 激酶缓冲液。
6. 将每个蛋白标准液 10μl 加入到 96 孔微量滴定板的两个孔内，从每个已稀释的细胞抽提物中吸取 10μl 加入到上述微量滴定板的两个孔内。向所有的孔内加入 200μl 考马斯蛋白测定试剂。
7. 在 595nm 波长（A_{595}）下读板，测定样品和标准物的吸收峰，绘制标准曲线（吸光度与浓度相对应）。用标准曲线，根据样品的吸光度来计算样品中含有的蛋白质的量。
8. 根据计算出的蛋白质的含量，从每个含有 40μg 的蛋白质的细胞抽提物中吸取一个体积至一干净的 1.5ml 的离心管中。向每个管中加入 1/3 体积的 4×SDS-PAGE 上样缓冲液，混合，煮沸 3min。向 12%SDS-PAGE 中加样和预染蛋白标准物（单元 7.1）。将凝胶放入电泳仪，在适当的缓冲液中，150V 电压进行电泳。
9. 在转移液中充分浸透醋酸纤维素薄膜。当染料的前端到达凝胶的下端时，将凝胶从电泳仪上移走，切掉浓缩胶，然后将凝胶与转移液一同放入一平底的容器内。
10. 将转移缓冲液倒入电转仪内，打开内转移器，驱走垫片上的气泡，凝胶、NC 膜和滤纸组成“三明治”。将 3MM Whatman 滤纸用转移缓冲液浸湿，将“三明治”放在浸湿的垫片上，浸湿的 NC 膜放在胶上，第二层 3MM Whatman 滤纸置于 NC 膜上，用吸管赶走各层间的气泡，将另一块湿垫置于转移“三明治”的上面。
11. 将制成的转移“三明治”（含有凝胶和醋酸纤维素薄膜）移入装有缓冲液的转移器内。醋酸纤维素薄膜侧朝向负极，凝胶侧朝向正极。将转移器与电源连接并通电（200mA 直流电，最好有冷却装置），电泳 2h。若有需要，可缩短电泳时间并向转移液中加入甲醇或 0.05%SDS 来提高转移的量（需要冷却装置）。
12. 转移结束后，切断电源，并且将 NC 膜从转移“三明治”上移走。用转移缓冲液洗涤 NC 膜从而去除附着的凝胶，然后将 NC 膜放入一平底的容器内。如有需要，可用丽春红 S 染色 NC 膜从而对蛋白质进行定量。
13. 向 NC 膜中加入 30～50ml 的封闭液，在室温下孵育 60min。
14. 根据产品说明用 TBST 稀释一抗（如单克隆抗体抗活性 MAP 激酶抗体）。在平底容器中以 15ml 的一抗工作液在 4℃与 NC 膜孵育过夜，或在 37℃孵育 30min 或室温下孵育 1～2h。

15. 在平底容器中用 TBST 洗涤 NC 膜，至少 3 遍，室温每次 15min。
16. 根据产品说明用 TBST 稀释二抗。在室温下，与 NC 膜孵育 45min。用 TBST 洗涤 NC 膜，至少 3 遍，室温每次 10min。
17. 应用 AP 检测方案（单元 7.7）来检测活化的 MAP 蛋白激酶。通过暴露或再现相同的 NC 膜上抗一般 MAP 激酶抗体来测定在所有范围内是否存在相同数量的 MAP 蛋白激酶（步骤 18～20）。
18. 室温下，在封闭液中孵育已染色的 NC 膜 30min。

如在两种抗体之间不存在空间位阻，则没有必要除去抗体，因为这两种不同类型的抗体都在被使用（小鼠和兔）。操作第二次印迹，应加入不同类型的抗体，然后按照步骤 18～20 操作。在这两步中，同一种属的抗体（小鼠或兔）或相互干扰的抗体在这两个步骤中（单元 7.7）都可以使用。但是如果这么做，在第 18 步操作前应洗膜。

19. 弃封闭液，按照第 15 步和第 16 步操作将 NC 膜与一抗（如多克隆抗一般的 MAP 激酶抗体）共同孵育，并且在第 16 步时使用 HRP 偶联羊抗兔抗体作为二抗。
20. 应用 ECL 检测方案（单元 7.7）显示一般 MAP 激酶的染色情况。NC 膜与 ECL 系统共同孵育 1min。用 3MM Whatman 滤纸干燥印迹，用塑料包装印迹，并暴露于 X 射线显像。

基本方案 2　由免疫印迹产生的免疫沉淀物来免疫监测蛋白质的磷酸化作用

当用基本方案 1 检测不到抗磷酸化蛋白质抗体时，此方案可以代替基本方案 1，因为此方案中的试剂很易获得。

材料（带√项见附录 1）

蛋白 A-琼脂糖凝胶珠子或相当物（如琼脂糖，HiTrap）
√室温的、冰冷的 PBS
适合蛋白质免疫沉淀的抗体（每个反应 1～5μg）
√冰冷的匀浆缓冲液
细胞裂解缓冲液中的细胞抽提液（基本方案 1，第 5 步）
√冰冷的 RIPA 缓冲液
冰冷的 0.5mol/L LiCl 溶液
√0.1mol/L Tris · Cl，pH8.0
√4×SDS-PAGE 上样缓冲液
预染标记物
12%SDS-聚丙烯酰胺凝胶（12%聚丙烯酰胺/0.32%双丙烯酰胺；单元 7.1）
上下旋转仪*
末端去除的吸头

* 译者注：End-over-end rotator 是指可上下颠倒旋转的仪器，建议译为上下旋转仪。

1. 将蛋白 A-琼脂糖凝胶珠子（约 150μl）加入 1.5ml 的离心管内，加入 1ml PBS，在室温下，让珠子膨胀 10min，然后向管内膨胀的珠子中再加入 1ml PBS，在室温下，15 000g 离心 1min。弃上清，共洗涤 3 次。
2. 向 250μl 被膨胀压紧的珠子（10～20μl 珠子/反应）中加入 300μlPBS 和 25μl 抗体。将其混合物放在垂直混合器上，室温下，以每分钟 10～30 圈旋转 1h，从而使抗体和蛋白 A 充分结合。用去除末端的吸头更容易处理珠子。
3. 将珠子重新悬浮在 1ml 冰冷的 PBS 中，室温下以 15 000g 离心 1min，弃上清，加入 1ml 冰冷的匀浆缓冲液。重复用匀浆缓冲液离心 2 次以上，最后用等体积匀浆缓冲液悬浮，在 4℃下储存抗体偶联的珠子的时间不超过 2d。
4. 将 40μl 抗体偶联的珠子（免疫磁珠）悬液（含有 20μl 珠子和 20μl 均匀缓冲液）加入到含有 300μl 的细胞抽提液样品中。此细胞裂解缓冲液含有 100～500μg 的总蛋白，在 4℃下，将离心管置于垂直混合器上，以每分钟 10～30 圈旋转 2h。
5. 用微型离心机在 4℃下以 15 000 g 离心抗体偶联磁珠。弃去上清，加入 1ml 冰冷 RIPA缓冲液，然后如前再离心一次，加入 1ml 冰冷的 0.1mol/L Li-Cl 离心两次，加入 1ml pH8.0 的冰冷 0.1mol/L Tris · Cl 离心一次，向每个洗过的磁珠标本中加入 30μl 的4×SDS-PAGE 上样缓冲液，煮沸 5min，然后于室温下以 15 000g 离心 1min，将上清和预染标记物加在 12%SDS-聚丙烯酰胺凝胶上样孔中（单元 7.1）。
6. 进行 SDS-PAGE 和免疫印迹实验（见基本方案，步骤 8～20）或蛋白激酶实验。

基本方案 3　组织培养细胞的荧光免疫染色

此方法主要用于测定信号反应的位置，而对于发生反应的激活水平则不太准确。

实验材料：（带√项见附录 1）

Rat1 细胞或相当物
√DMEM/10%FBS
√血清饥饿培养基：DMEM/0.1%FBS
√PBS
3%（w/v）多聚甲醛/PBS
通透缓冲液：PBS/0.2%（v/v）Triton X-100
一抗
二抗：FITC 偶联羊抗兔和罗丹明偶联羊抗鼠
封片剂（如 Polymount，Polyscience）
6 孔组织培养板
22mm² 无菌盖玻片
2 张 10cm×20cm 的封口膜
共聚焦或荧光显微镜

1. 用 6 张大小为 22mm² 的盖玻片分别放置在 6 孔组织培养板的每个孔内。在每个孔内

加入 2ml 含有 30 000 个 Rat1 细胞的 DMEM/10%FBS。培养 24h，弃去培养基，换用血清饥饿无双抗的培养基，再培养 14h（见基本方案 1，步骤 1），弃去培养基，然后向每个孔中加入 2ml DMEM/10%FBS，培养 30min。

2. 在室温下用 5mlPBS 洗孔 2 次，向每个孔中加入 2.5ml 3%多聚甲醛/PBS，20min 后，弃去多聚甲醛溶液，分别用 5ml PBS 洗涤 3 次，不移去盖玻片。向每个孔中加入 2ml 通透缓冲液，作用 5min，弃去通透缓冲液。向每个孔中加入 5ml PBS，作用 2min，然后弃去，用 PBS 重复清洗 2 次。
3. 将一张 10cm×20cm 的封口膜固定在一清洁、平稳的工作台桌面上。
4. 在室温下以 15 000*g* 离心一抗 5min。按照厂家说明用 PBS 稀释一抗。在封口膜工作台上，滴 6 滴稀释后（1∶20～1∶500）的一抗，每滴 40μl，每滴间距大约 5mm。用小镊子将孔板中固定和通透后的细胞盖片，盖在这 6 滴液体上，注意盖片的细胞一侧朝下，室温孵育 45min。
5. 用小镊子夹起盖玻片，倾斜，然后用擦镜纸轻轻的接触盖玻片的边缘，从而吸去抗体溶液，然后将这些盖玻片再次放入 6 孔板的 6 个孔中，细胞一侧朝上，用 2ml PBS 洗孔 3 次，每次 10min。
6. 在室温下以 15 000*g* 离心罗丹明偶联羊抗鼠二抗 1min。用 PBS 稀释二抗（1∶100～1∶500）。如步骤 3，再准备一张新的 10cm×20cm 的封口膜，然后吸取 40μl 离心后的二抗，置于封口膜上，用盖玻片盖在每滴液体上，细胞一侧朝下，室温孵育 45min。
7. 如上述步骤 5（用镊子从抗体上夹起盖玻片，用擦镜纸吸去残余的抗体）。然后将盖玻片放回 6 孔培养板中，细胞一侧朝上，用 2ml PBS 清洗 3 次，每次 10min。
8. 在每个载玻片上滴一滴封片剂，用小镊子从每个孔中取出盖玻片，然后用擦镜纸轻擦盖玻片边缘，吸出残余的 PBS，将盖玻片的带有细胞的一侧向下盖在封片剂滴液上，至少可避光储存载玻片过夜。
9. 用普通或共聚焦荧光显微镜，通过检查处理的载玻片来检测荧光染色。记录每个细胞中的染色程度和每个样品中染色细胞的百分比。

参考文献：Gabay et al.，1997

撰稿人：Zhong Yao and Rong Seger

单元 9.3　MAP 蛋白激酶信号的检测

警告： 凡涉及到放射性的实验，研究者应该戴手套，并且应该小心千万不要污染自己和所穿着的衣物。使用 ^{32}P 的实验，研究者应该经常使用便携式监测仪来检查自己以及使用放射性元素的实验环境。任何放射性污染物应当按照适当的程序被清除干净。放射性废物应该在适当的地点处理。遵照当地的放射性物质安全监督条例。

注意： 所有与活细胞接触的溶液或器械都必须无菌。合理应用无菌术，除非具体说明，否则所有的培养基均在湿润的 37℃、含有 5% CO_2 的培养箱中进行。某些培养基

（如 DMEM）需要改变 CO_2 浓度使 pH 维持在 7.4。

基本方案 1　通过免疫沉淀反应测定 MAP 激酶（ERK）的活性

应用适当的试剂，此种方法可以检测多种 MAPK 的亚型和 MAPK 级联反应的其他成分。由于固体支持物可能影响激酶活性，因此测定结果不是总能准确反映出待测激酶的特定活性。这里以 ERK 为例。

注意： 抽提应尽快完成以抑制磷酸酶活性。抽提缓冲液应加入特定的磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂，并且抽提应在低温下完成。

材料：（带√项见附录 1）

√匀浆缓冲液，预冷

6 个 6cm 的培养有表皮生长因子刺激的 Rat1 细胞的组织培养皿（单元 9.2，基本方案 1，步骤 1～2）或相当物（例如，组织培养细胞系、匀浆的动物器官、完整的低等生物体）

√激酶缓冲液，预冷

蛋白标准：每毫升分别含有 5、10、20、50、100 和 200μg BSA 的细胞抽提（如均化）缓冲液

考马斯蛋白测定试剂（Pierce）

√膨胀、填满蛋白 A-琼脂糖凝胶珠子（单元 9.2，基本方案 1，步骤 1～2）

√PBS，预冷

用于与珠子偶联的抗体：抗 ERK C 末端抗体（如 Sigma）

√RIPA 缓冲液，预冷

0.5mol/L LiCl 缓冲液，预冷

√RM×3

免疫肽（可选）

150mmol/L 磷酸（可选）

液闪液（可选）

2mg/ml 髓磷脂基质蛋白（MBP）

√4×SDS-PAGE 上样缓冲液

16～175kDa 预染蛋白标记物（New England Biolabs）

电泳缓冲液：25mmol/L TrisCl（pH8.3）/188mmol/L 甘氨酸/0.1%（w/v）SDS

染色液：40%（v/v）甲醇/7%（v/v）乙酸水溶液/2.5%（w/v）考马斯亮蓝 R-250

脱色液：15%（v/v）甲醇/7%（v/v）乙酸水溶液

1ml 移液管，预冷至 4℃

超声裂解仪

1.5ml 微量离心管，预冷至 4℃（6 只一套，共 4 套，每套分别标记 1～6）

96 孔平底微量滴定板

微量酶标仪，波长 595nm
末端去除的吸头
垂直混合器
磷酸纤维试纸
试管加热器/振荡器（如 Eppendorf Thermomixer）或 30℃水浴
Whatman 3MM 滤纸，略大于凝胶

1. 于 6 个 6cm 培养有 EGF 刺激的 Rat1 细胞组织培养皿中各加 350μl 预冷的匀浆缓冲液（凭经验决定最佳激活时间）。轻轻地倾斜培养皿，用塑料刮刀或橡皮刮刀刮细胞至缓冲液中，使用预冷的移液管将细胞和缓冲液移至标记好的 1.5ml 预冷的微量离心管中，超声裂解仪在冰上破碎细胞（每 0.5ml 样品用 2 个 7s，50W 的脉冲）。

   应用无离子清洗剂抽提时，测定蛋白质浓度有时会有困难，一些激酶常用 RIPA 缓冲液或冷冻解冻方法抽提，但这些方法缺乏有效性（单元 9.2）。
2. 于 4℃ 14 000*g* 微量离心细胞裂解液 15min。转移上清液至预冷的做好标记的新管中，取出 5～10μl 裂解液用于测定蛋白质浓度（用于比较则不宜以细胞数为准），保存每份剩余的细胞裂解液，冻存、备用（45～90min 内）。
3. 取 10μl 细胞裂解液（总体稀释度≥1∶20）加到含有 190μl 激酶缓冲液的做好标记的 1.5ml 微量离心管中。取用细胞抽提液稀释的标准蛋白 10μl 加入平底的 96 孔微量滴定板的 2 孔中，取每个稀释的细胞裂解液 10μl 至相同的微量滴定板的 2 孔中，加 200μl 考马斯亮蓝蛋白测定试剂至所有标记的微量滴定板。
4. 将微量滴定板放入微量酶标仪中，测波长 595nm 的吸光光度值，与标准品吸收标准曲线比较，计算细胞抽提物的蛋白质浓度。
5. 在计算蛋白质浓度的基础上，将含有 100～500μg（推荐用 300μg）蛋白质的细胞裂解液转移至新的、预冷的微量离心管中。
6. 应用末端去除的吸头将 180μl 膨胀、填满的蛋白 A-琼脂糖凝胶珠子（通常 10～20μl 珠子/反应）加入 1.5ml 微量离心管中，根据使用说明稀释抗体，即加入 320μl 磷酸盐缓冲液和 25μl 抗体使其与珠子结合。在垂直混合器上室温孵育混合 1h（或 4℃16h）使抗体与蛋白 A 结合。理论上，做这一步骤应先于准备细胞裂解液或同时进行。
7. 重新悬浮珠子于 1ml 冰冷磷酸盐缓冲液中，于 4℃ 14 000*g* 微量离心 1min。弃去上清液，加入 1ml 冰冷均化缓冲液，用均化缓冲液重复离心 3 次以上，最后加入相同体积的冰冷均化缓冲液，4℃储存 3 天以内。
8. 在 30μl 抗体偶联的珠子悬液中加入 300μl 含总蛋白 50～500μg 的细胞裂解液标准品至于预冷的 1.5ml 微量离心管中，在垂直混合器中 4℃孵育 2h。
9. 于 4℃ 14 000*g* 微量离心蛋白 A-琼脂糖凝胶珠子/细胞裂解液混合物 1min，弃去上清液，加 1ml 冰冷 RIPA 缓冲液，离心，方法同前。加 1ml 冰冷 0.5mol/L LiCl 重复离心 2 次后，加 1ml 冰冷激酶缓冲液离心两次。
10. 末次冲洗后，通过弃去上清液从偶联的珠子中彻底除去激酶缓冲液，不加缓冲液 4℃ 14 000*g* 微量离心 1min，彻底除去珠子上层残余的缓冲液。
11. 在 15μl 水中重悬珠子。准备用于少量放射性操作的实验台，每管加入10μlRM×3。

如果通过加入过量的免疫肽从珠子释放激酶（加 RM×3 之前或之后）测定激酶活性，则激酶活性可通过以下描述测定或通过不影响珠子的试纸实验测定。如使用试纸实验，磷酸化反应的测定可通过在每个方型磷酸纤维试纸上滴加 20μl 抽提物并立即用 150mmol/L 磷酸冲洗而终止反应。测定磷酸盐渗入用液闪和计数器。

12. 加 5μl 2mg/ml MBP（底物应是可被磷酸转移酶磷酸化的）到每个指管，将混合液放入 30℃ 指管加热/振荡器或水浴中，在恒定或一定频率的振荡下，30℃ 孵育 20min，加 10μl 4×SDS-PAGE 上样缓冲液到每个指管以终止磷酸化反应，煮沸 5min，室温 14 000*g*，离心 1min。
13. 准备一块浓度为 15%分离胶、3%积层胶的凝胶（单元 7.1），在凝胶上加样品和 16～175kDa 预染蛋白标记物。150V 恒定电压直到溴酚蓝染料到达距离凝胶底部约 0.5cm（约 1h）。
14. 将凝胶放入平皿，加 50ml 染色液，室温染色 20min，去掉染色液并加 50ml 脱色液脱色 30min，重复脱色 3 次，每次用 50ml 脱色液脱色 30min。

    或者也可将蛋白质转移到醋酸纤维素薄膜上（单元 9.2，基本方案 1，步骤 9～20），按下面方式显影。
15. 将凝胶放在 Whatman 3MM 滤纸上，盖上塑料封套，用干燥器干燥凝胶，80℃ 1.5h。将凝胶暴露在磷屏仪或 X 射线胶片上（单元 7.8）。

基本方案 2　凝胶内激酶测定

如果不知道激酶的特征或没有具体的抗体可供激酶利用，凝胶内激酶测定可被用来代替免疫沉淀反应。用这种方法可以显示蛋白激酶的分子质量，并且可以鉴定新的蛋白激酶。然而，在本方案的条件下，并不是所有的蛋白激酶都能被复性，并且这种鉴定的线性范围通常有限。因此，这种方法不应当用作常规检测及鉴定蛋白激酶的特征。

材料（带√项见附录 1）

√血清饥饿的、表皮生长因子刺激的 Rat1 细胞裂解产物（单元 9.2，基本方案 1，步骤 1～8）或细胞质抽提物（参见基本方案 1，步骤 1 和 2）
√4×SDS-PAGE 上样缓冲液
2mg/ml 髓磷脂碱性蛋白
√1.5mol/L Tris · Cl，pH8.8
√30%丙烯酰胺/0.8%双丙烯酰胺
√10%过硫酸铵
四甲基乙二胺（TEMED）
20%异丙醇/50mmol/L 羟乙基哌嗪乙烷磺酸（HEPES），pH7.6
复性缓冲液：50mmol/L 羟乙基哌嗪乙烷磺酸（pH7.6）/5mmol/L 2-巯基乙醇
√激酶缓冲液含 6mol/L 尿素
复性缓冲液/0.05%聚山梨醇酯 20（Tween20）
凝胶内激酶缓冲液：20mmol/L HEPES（pH7.6）/20mmol/L $MgCl_2$

凝胶内激酶缓冲液/2mmol/L DTT/20μmol/L ATP/100μCi [γ-^{32}P] ATP5%三氯乙酸（TCA）/1%焦磷酸钠（$NaPP_i$）

水浴，30℃，用适当屏蔽隔离放射性工作

1. 测定细胞裂解物或细胞溶质抽提物的蛋白浓度（参见基本方案1，步骤1、3和4）在计算蛋白浓度的基础上，将含30～80μg蛋白质的每种细胞裂解物加入新的1.5ml微量离心管中，每管各加1/4体积SDS-PAGE电泳上样缓冲液，充分混匀，4℃保存（不要煮沸）。
2. 准备含MBP的8ml 12%聚丙烯酰胺凝胶（分离凝胶），加入0.7ml水、2.0ml 2mg/ml MBP、2.0ml 1.5mol/L Tris·Cl及3.2ml pH8.8 30%丙烯酰胺/0.8%双丙烯酰胺、100μl 10%过硫酸铵和6μl TEMED。分离胶聚合后，配制3%积层胶（单元7.1）。
3. 在凝胶中加入样品和预染标记物（单元7.1），100V电泳（温度不超过100℃），直到染料距凝胶底部0.5cm（约90min）。
4. 将凝胶从装置中取出，切除积层胶，小心放入平底容器中，用pH7.6 20%异丙醇/50mmol/L HEPES 100ml，室温清洗2次，每次30min（第二次清洗可4℃过夜）。用100ml复性缓冲液室温重复清洗2次，每次30min。用100ml 6mol/L尿素激酶缓冲液室温重复清洗2次，每次15min。
5. 将凝胶置于4℃冷室，弃去50ml清洗液，加50ml复性缓冲液/0.05%Tween 20，振荡15min，重复两次。用100ml复性缓冲液/0.05%Tween20清洗凝胶3次，每次15min，4℃振荡凝胶过夜。
6. 弃去清洗液，加30ml凝胶激酶缓冲液，30℃孵化30min，弃去缓冲液，加20ml凝胶激酶缓冲液/2mmol/L DTT/20μmol/L ATP/100μCi [γ-^{32}P] ATP，30℃水浴孵育2h（确保凝胶在容器中挺直平整）。
7. 用5%TCA/1%NaPPi小心的清洗凝胶4次，每次15min，室温。如果凝胶仍有放射性，则清洗过夜，干燥凝胶（参见基本方案1，步骤15）进行放射自显影。

基本方案3 JNK测试

固定Jun的数量是限制因素，该测试的线性范围有一定的限制。

材料（带√项见附录1）

来源于血清饥饿的、表皮生长因子刺激的Rat1细胞溶质抽提物（参见基本方案1，步骤1～2）

√10×结合缓冲液

GST-Jun串珠：GST-Jun（1～91）谷胱甘肽偶联珠子（见支持方案）

√HB1B缓冲液，预冷

√JNK激酶缓冲液，预冷和室温

10×ATP混合物：20mmol/L未标记的ATP/2μCi [γ-^{32}P] ATP，现用现配

√4×SDS-PAGE上样缓冲液

16～175kDa 预染蛋白标记物（New England Biolabs）
1.5ml 微量离心管，预冷
指管加热器/振荡器（如 Eppendorf Themomixer）或水浴，30℃

1. 测定细胞溶质抽提物的蛋白浓度（参见基本方案 1，步骤 3 和 4）。取 150μl 胞质抽提物或细胞裂解物（50～500μg 蛋白质）、30μl 结合缓冲液、100μl 水和 20μl GST-Jun 珠子置于预冷的 1.5ml 微量离心管中，4℃孵育 1h 并不断振荡，4℃14 000*g* 离心 2min，弃去上清。

   GST-Jun 珠子数量可以随着结合到珠子的蛋白质的量变化而变化，每 20μl 珠子含2～4μg蛋白质通常会得出好的结果。这类实验推荐使用 Jun 的截短形式（残基1～91），但如果有全长或 1～74 结构会得出相似结果。

2. 重悬沉淀的珠子于 1ml 冰冷的 HB1B 缓冲液中，4℃ 14 000*g* 微量离心 2min，每次离心后弃去上清液。重复离心 2 次，一次用 1ml 冰冷的 HB1B 缓冲液，一次用 1ml 冰冷的 JNK 激酶缓冲液，每次离心后弃去上清液。
3. 取 30μl 室温 JNK 激酶缓冲液加入到沉淀的珠子中，将指管放入 30℃加热器/振荡器或水浴中，加 3μl 10×ATP 混合物，盖紧指管，振荡孵育 20min。
4. 加入 11μl 4×SDS-PAGE 上样缓冲液，将样品煮沸 5min，准备一份含 3%积层胶的 12%SDS 聚丙烯酰胺凝胶（单元 7.1）。将样品和预染蛋白标记物加入凝胶。以 150V 恒压电泳凝胶直至溴酚蓝距凝胶底部 0.5cm（大约 1h）。染色、干燥、分析凝胶（参见基本方案 1，步骤 14 和 15）。注意找 46kDa 的条带（截短的 GST-Jun 的分子质量）或许也可能在 30kDa 处（GST-Jun 降解产物及 JNK 活力良好的标记）找到条带。

支持方案　GST-JUN-谷胱甘肽珠子的准备

材料（带√项见附录 1）

以GST-Jun（1～91）表达质粒——DNA 转化的细菌可以从数个研究者处得到，也可以购买到商品化的产品（如 Calbiochem）
√加适当抗生素的 LB 培养基
100mmol/L 异丙基半乳糖苷（IPTG 于－20℃储存不超过 1 年）
√PBS/蛋白酶抑制物，冻存
√洗涤过的谷胱甘肽珠子
PBS/蛋白酶抑制物/20%（v/v）甘油，冻存
垂直混合器

1. 用 GST-Jun 表达质粒，30℃ 4L 选择性 LB 培养基培养转化细菌直至 OD_{600} 达 0.6（约 3～4h），加 100mmol/L IPTG 至 0.4mmol/L 后继续培养细菌 4h，30℃。
2. 4℃ 6000g 离心 10min。重悬沉淀的珠子于 80ml 冷冻 PBS/蛋白酶抑制剂，超声裂解，4℃ 15 000*g* 离心 10min。转移上清液至新管中，重复离心，弃去沉淀，加 3ml

洗涤过的谷胱甘肽珠子至上清液，4℃ 20r/min 混合 2h。

3. 用冰冷的 PBS 水溶液洗涤珠子 3 次。加 8mlPBS/蛋白酶抑制剂/20%（v/v）甘油，4℃储存 1～2 天或－20℃储存 4 个月。

参考文献：Campbell et al.，1995；Kameshita and Fujisawa，1989；Seger and Krebs，1995

撰稿人：Hadara Rubinfeld and Rony Seger

（王艾琳　安倍莹　曲　莉　宋　艳译）

第 10 章　蛋白质转运

如第 3 章的介绍中所述，真核细胞并非是无定形原生质的简单液囊，而是由一系列膜包裹结构，即所谓的细胞器构成的。亚细胞分离（第 3 章）和显微分析（第 5 章）揭示了亚细胞器惊人的多样性，包括细胞核、内质网（ER）、高尔基体、溶酶体、内体、分泌性颗粒（secretorygranule）、质膜、线粒体、过氧化物酶体、叶绿体和在特化细胞中发现的大量其他结构。这些细胞器都履行着独特的功能，而这些功能又是由一系列特殊的细胞器蛋白质来完成的。与胞质内、细胞外蛋白质的合成一样，指导大部分细胞器蛋白质合成的遗传信息是由核内 DNA 编码的。基因组 DNA 转录成为信使 RNA（单元 12.9），然后由此翻译成蛋白质（单元 12.1）。在翻译的同时，蛋白质便开始了向细胞内或胞外空间不同位置转运的旅程。一些蛋白质合成自胞质中的游离核糖体。这些蛋白质要么在胞质中保持可溶状态，与大分子结构如细胞骨架合为一体，要么被运送进入细胞核、线粒体、过氧化物酶体、叶绿体，有些情况下也会进入内质网。其他蛋白质在内质网膜表面的核糖体上合成。这些蛋白质转位穿过该内质网膜，随后被分配到分泌和内吞通路的不同隔室内，它们包括 ER 的特定部位、高尔基体复合物、溶酶体、内体、分泌性颗粒和质膜；另外一些情况下它们也会被分泌入胞外介质。因此，细胞内部是一个高度动态的环境，蛋白质的分布具有异质性但被精确控制，这些都是通过许多蛋白质转运途径实现的。

研究特定蛋白质运输步骤及其分子机制的体外分析将在第 12 章中讨论。然而，体外分析只有在能反映细胞内真实的运输过程时才有效。另外，蛋白质在不同细胞隔室间转运的路线常常很复杂，以至于在体外无法重建，在完整的细胞中研究是最佳的。

第 10 章专门讨论用于蛋白质转运体内研究的生化和形态学分析。大部分通过分泌或内吞途径分配到细胞器，或者分泌到胞外介质的蛋白质，在翻译的同时添加糖链进行修饰。当蛋白质穿过分泌性途径不同的隔室时，糖链逐渐被重组。因此，存在于蛋白质上的糖类型起着记录其在细胞中穿行路线的作用。通过用一系列特定糖苷酶处理免疫沉淀得到的标记的蛋白质（单元 8.1，单元 8.5），可以很方便地对糖蛋白糖链进行整体分析。单元 10.1 提供了一系列分析体内标记糖蛋白糖链一般结构的方案。

即使是蛋白质到达细胞中的指定位置，它们依然处于持续的变化之中。事实上，大部分蛋白质都不是固定在某个位置上，而是通过减少流失和回收途径维持一个特定的稳态分布。一些质膜蛋白并不十分符合上述特征，如内吞受体，它虽然快速内化，但是在内体系统稍作停留便返回细胞表面。单元 10.2 提供了一系列采用放射性碘标记转铁蛋白为探针，测量转铁蛋白受体——一个典型的内吞受体的稳态分布、内化和再循环的生化技术。另外还提供了测量任意膜蛋白（即使是那些不存在生理学配体的膜蛋白）稳态分布、内化和再循环的方案，即采用放射性碘标记的抗体或 Fab 片段作为探针。最后，本单元也论及了测量从介质中液相摄取和抑制内吞作用的方法。

在细胞表面表达的主要膜蛋白都是在内质网上合成，然后通过分泌性途径转运到质膜上。当这些蛋白质到达细胞表面时，几乎所有的翻译后修饰都已完成。单元 10.1 所描述的糖分析方法不能用于测量已到达细胞表面蛋白质的动力学。然而，人们已经利用外加试剂对细胞表面蛋白质的可接近性开发出了分析生物合成蛋白转运到质膜过程的方法。单元 10.3 包含了若干个方案，它们整合了脉冲追踪代谢标记（单元 8.1）和对完整细胞表面蛋白的修饰处理——用唾液酸酶水解唾液酸残基和生物素标记。检测修饰的表面暴露蛋白可以采用所介绍的对修饰敏感的电泳或免疫沉淀技术。

虽然人们通常认为质膜是一个单独的隔室，但是大部分真核细胞显示出不止一个质膜区域。极化的上皮细胞大概是具有特化质膜区域的细胞中最适用于研究的例子。在上皮细胞中，这些区域称为顶部和基底外侧。蛋白质通过不同的途径转运到这两个区域或从这里离开，单元 10.4 将集中介绍该分析方法。为使分析极化的分选成为可能，这些细胞需要在特殊的、装有渗透膜的小室中生长。细胞形成一个紧密的单分子层，由此顶端和基底外侧区域被分开。在小室中，顶端和基底外侧介质分别适于添加试剂或收集分泌的蛋白质。本单元包含的方案包括：代谢标记极化的上皮细胞和收集顶端和基底外侧表面分泌的蛋白质、稳定转染和转染克隆的筛选、在滤膜上培养上皮细胞、检测上皮单细胞层的泄漏性、监测新合成蛋白质到达两个质膜区域，以及长成极化单细胞层的上皮细胞的间接免疫荧光显微技术。

撰稿人：Juan S. Bonifacino

单元 10.1 用糖苷酶研究蛋白质转运

糖链修饰经常用于监测通过分泌性途径的糖蛋白的运动。这是因为逐步的糖链加工是单向性的，并且通常是对蛋白质向前的或前进性的运动作出的响应。其最低要求是这些蛋白质可以被代谢性标记（单元 8.1）、可被免疫沉淀（单元 8.5）和在凝胶或印记上清晰可见（单元 7.8）。糖链本身将不被分析，而它们的存在和结构可以从经一个或多个酶消化后的凝胶迁移差异显现出来。表 10.1.1 是一些酶和它们的应用的一个总结。

表 10.1.1 本单元描述的酶

酶	说明和用途	监测[a]
EndoH	将高甘露糖转化为复杂形式的 *N*-连接糖链	高尔基体顺面到中间
PNGaseF	*N*-连接糖链的存在；切割几乎所有 *N*-连接糖链；仅有的可以切割四支糖链的酶	高尔基体中间层
Sialidase	获得唾液酸	反面高尔基体和 TGN

a. TGN，高尔基体反面管网结构。

注意： *避免钾盐缓冲液，因为它们可能会引起 SDS 钾盐沉淀。*

基本方案 1 内切糖苷酶 H 消化

内切糖苷酶 H（endoH）在两个 *N*-乙酰葡糖胺（GlcNAc）残基间切割 *N*-连接寡

糖，这两个残基位于含高甘露糖的、混合但不复杂的寡糖的寡糖链核心区域。但蛋白质在内质网中以及高尔基复合体的早期区域时对 endoH 敏感，它们经过高尔基体中间层酶加工后对 endo 具有抗性。

材料（带√项见附录 1）

感兴趣的免疫沉淀蛋白（单元 8.5）

0.1mol/L 2-巯基乙醇（2-ME）/0.1%（w/v）SDS（电泳级超纯；新鲜制备）

0.5mol/L 柠檬酸钠，pH5.5

1%（w/v）苯甲基磺酰氟（PMSF）异丙醇溶液

0.5 U/ml 内切糖苷酶（endoH，天然或重组，Sigma、Glyko 或 Boehringer Mannheim）

√10×SDS-PAGE 上样缓冲液

水浴，30～37℃以及 90℃

1. 向微型离心管中的免疫沉淀中加入 20～30μl 0.1mol/L 2-ME/0.1%SDS，适当混匀，90℃加热 3～5min 变性。冷却并在 1000*g* 离心 1s，收集管底聚集的液滴。
2. 将 10μl 溶解的变性蛋白质（上清液）等分到两个干净微型离心管中，一个作为对照（不加酶），另一个用于消化（加酶）。
3. 按以下顺序加入各试剂，每次加完均混匀。

   6μl 0.5mol/L 柠檬酸钠，pH5.5

   20μl 水

   2μl 1%PMSF（异丙醇溶液）

   1μl 0.5U/ml endo H（仅仅是加酶组；对照组加水代替）

   30～37℃水浴过夜。
4. 电泳前，加 4μl 10×SDS-PAGE 上样缓冲液，并于 90℃加热 5min 以使 endoH 失活。
5. 用一维 SDS-PAGE（单元 7.1）和放射自显影（单元 7.8）分析蛋白质。

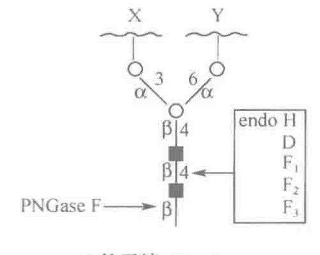


图 10.1.1 PNGaseF 和 N-连接寡糖核心处内切糖苷酶敏感键

PNGaseF 是一种糖苷酶，切割 ClcNAc 和 Asp 之间的键，释放整个糖链并使 Asn 转变为 Asp。内切糖苷酶（H、D 和 Fs）切割核心区域两个 ClcNAc 残基之间的键，其中一个 GlcNAc 依然结合在蛋白质上。内切糖苷酶不同的特异性基于整个变性蛋白质的糖链结构。不完全的变性可能不能暴露所有敏感的连接。X 和 Y 是非特异糖残基

基本方案 2　肽：*N*-糖苷酶 F 消化

PNGaseF 是一种糖苷酶，它切割蛋白质的 Asp 残基与 GlcNAc 残基（连接糖与蛋白质）之间的糖肽键（图 10.1.1）。因为它可以从糖蛋白上释放几乎所有已知 *N*-连接寡糖，所以它被指定为完全去除 *N*-连接糖链的酶。它是唯一一个可以释放四支链糖链和五支链糖链的酶。

材料（带√项见附录 1）

感兴趣的免疫沉淀蛋白（单元 8.5）

0.1mol/L 2-巯基乙醇（2-ME）/0.1%（w/v）SDS（电泳级超纯；新鲜制备）

√0.5mol/L Tris·Cl，pH8.6（37℃测定）

10%（w/v）Triton X-100 或者 Nonidet P-40（NP40）

200～250mU/ml 肽：*N*-糖苷酶 F（PNGaseF；Sigma 或 Glyko）

√10×SDS-PAGE 上样缓冲液

水浴，30～37℃以及 90℃

1. 免疫沉淀蛋白在 20～30μl 0.1mol/L 2-ME/0.1%SDS 中于 90℃加热 3～5min 变性。冷却并在 1000*g* 离心 1s，收集管底聚集的液滴。
2. 将 10μl 上清液等分到两个微型离心管中，一个作为对照（不加酶），另一个用于消化（加酶）。
3. 按以下顺序加入各试剂，每次加完均混匀：

   3μl 0.5mol/L Tris·Cl，pH8.6

   5μl 水

   2μl 10%NP40 或 TritonX-100

   5μl 200～250mU/ml PNGase F（仅仅是加酶组；对照组加水代替）

   30～37℃水浴过夜。

   磷酸盐或 HEPES 缓冲液（pH7.0）可以用于代替 Tris·Cl。非离子型去垢剂的使用很重要，因为 SDS 可以使 PNGase F 失活。上述任一非离子型去垢剂的用量超过 SDS 总量的 10 倍则可以稳定该酶。
4. 电泳前，加 2.5μl 10×SDS-PAGE 上样缓冲液，并于 90℃加热 5min 以使酶失活。
5. 用一维 SDS-PAGE（单元 7.1）和放射自显影（单元 7.8）分析蛋白质。

基本方案 3　唾液酸酶（神经氨酸苷酶）消化

唾液酸是许多 *N*-和 *O*-连接的寡糖的最后一个糖。由于唾液酸带电，因此它们影响蛋白质的凝胶迁移率，使之比预期的正常分子质量要更大些。为了确定唾液酸酶的效果，样品可以在二维系统中分析，第一维采用 IEF 或 NEPHGE（单元 7.3）。唾液酸的存在（唾液酸酶敏感）经常被用于显示蛋白质进入高尔基体反面网络结构（TGN）的转运。

材料（带√项见附录 1）

感兴趣的免疫沉淀蛋白（单元 8.5）

0.1mol/L 2-巯基乙醇（2-ME）/0.1%（w/v）SDS（电泳级超纯；新鲜制备）

10%（w/v）Triton X-100 或者 Nonidet P-40（NP40）

√0.5mol/L 乙酸钠，pH5.0

1IU/ml 神经氨酸苷酶，来自 *Arthrobacter ureafaciens*（Sigma 或 Glyko）

√10×SDS 上样缓冲液

水浴，37℃以及 90℃

1. 免疫沉淀蛋白在 20～30ul 0.1mol/L 2-ME/0.1%SDS 中于 90℃加热 3～5min 变性。冷却并在 1000g 离心 1s，收集管底聚集的液滴。
2. 将 10μl 上清液等分到两个干净微型离心管中，一个作为对照（不加酶），另一个用于消化（加酶）。
3. 按以下顺序加入各试剂，每次加完均混匀：

   2μl 10%TritonX-100 或者 NP40（超过 SDS 量的 20 倍）

   4μl 0.5mol/L 乙酸钠，pH5.0

   5μl 水

   1μl 1IU/ml 神经氨酸苷酶（仅仅是加酶组；对照组加水代替）

   37℃水浴过夜。
4. 电泳前，加入 2μl 10×SDS 上样缓冲液，于 90℃加热 3～5min 以使酶失活。

   如果蛋白质将用 IEF 或 NEPHGE 分析的话，加入使用这些技术所用的裂解缓冲液来替代上样缓冲液。
5. 用适当的一维 SDS-PAGE 系统（单元 7.1）或者二维 IEF/SDS-PAGE 或 NEPHGE/SDS-PAGE 系统（单元 7.3）分析蛋白质，用放射自显影（单元 7.8）检测。

基本方案 4　α 内切-*N*-乙酰氨基半乳糖苷酶

该酶（也称 O-糖苷酶或 O-聚糖酶）的应用很局限，因为它切割的键很特异，只有一个 O-连接二糖——Galβ1-3GalNAcα-Ser/Thr。与唾液酸联用，该酶可用于证明糖蛋白中存在 O-连接链。

材料（带√项见附录 1）

感兴趣的免疫沉淀蛋白（单元 8.5）

0.1mol/L 2-巯基乙醇（2-ME）/0.1%（w/v）SDS（电泳级超纯；新鲜制备）

0.5 mol/L 柠檬酸磷酸钠缓冲液，pH6.0，含 500μg/ml BSA（完全缓冲液提供给酶）

10%（w/v）TritonX-100 或者 NonidetP-40（NP40）

300mU/ml α 内切-*N*-乙酰氨基半乳糖苷酶（5×浓度来自 Glyko；按说明书使用）

√10×SDS 上样缓冲液

水浴，37℃以及 95℃

1. 免疫沉淀蛋白在 20～30ul 0.1mol/L 2-ME/0.1%SDS 中于 95℃加热 3～5min 变性。冷却并在 1000g 离心 1s，收集管底聚集的液滴。
2. 将 10μl 上清液等分到两个微型离心管中，一个作为对照（不加酶），另一个用于消

化（加酶）。

3. 按以下顺序加入各试剂，每次加完均混匀：

   2μl 10%TritonX-100 或者 NP40（超过 SDS 量的 20 倍）

   4μl 0.5mol/L 柠檬酸磷酸钠缓冲液，pH6.0，含 500μg/ml BSA

   3μl 水

   1μl 300mU/ml α 内切-*N*-乙酰氨基半乳糖苷酶（仅仅是加酶组；对照组加水代替）

   37℃水浴过夜。

4. 电泳前，加入 2μl 10×SDS-PAGE 上样缓冲液，并于 90℃加热 5min 以使酶失活。
5. 用一维 SDS-PAGE（单元 7.1）和放射自显影（单元 7.8）分析蛋白质。

参考文献：Bechers et al.，1987；Chui et al.，1997；Kornfeld and Kornfeld，1985；Tarentino and Plummer，1994

撰稿人：Hudson H. Freeze

单元 10.2　内吞作用

细胞通过内吞作用途经将胞外介质中大量的大分子（如生长激素、营养物质、病毒）进行内化。另外，内吞性细胞膜转运在蛋白质组成性的和调控性的定位于细胞膜隔室（如质膜、内体和高尔基体反面网络结构）中起着重要作用。

警告：当进行放射性操作时，采取正确的防护措施以避免污染实验者和周围环境。在正确指定的区域内进行实验以及处理废物，按照当地放射性安全官员提供的指导进行（见单元 8.4）。

注意：当实验在 CO_2 培养箱中进行时，采用重碳酸缓冲介质；当实验在空气中操作时，采用 HEPES 缓冲介质。

基本方案 1　测量转铁蛋白受体在表面和内部间的稳态分布

膜蛋白在表面和细胞内部的稳态分布取决于它的内化速率和再循环速率。

材料（带√项见附录 1）

感兴趣的细胞

√SF 培养基

^{125}I 标记的人二铁转铁蛋白（约 500cpm/ng；见支持方案 2）

未标记（非放射活性）人二铁转铁蛋白

√中性 pH 缓冲液，冰置冷却

√pH2.0 缓冲液，冰置冷却

增溶溶液：1%（w/v）Triton X-100 的 0.1mol/L NaOH 溶液

10mg/ml BSA

6 孔组织培养板

γ 计数器和试管

1. 实验前两天在两个含有 SF 培养基的 6 孔组织培养板中按 1×10^5 个/孔接种细胞，使得在实验当天细胞汇合率达到约 80%（约 5×10^5 个/孔）。
2. 每孔用 2ml SF 培养基洗涤 6 孔板。将 1ml 含饱和浓度（3μg/ml）^{125}I 标记转铁蛋白的 SF 培养基加入 4 个孔（放射性总量孔）中。将 1ml 含 3μg/ml ^{125}I 标记转铁蛋白以及 200 倍浓度的未标记二铁转铁蛋白的 SF 培养基加入另外 2 个孔（非特异性放射活性孔）。在 37℃充分孵育使 ^{125}I 标记的转铁蛋白占据所有转铁蛋白受体。
3. 将板冰置，并用 2ml/次预冷的中性缓冲液洗涤 6 次。

   内吞作用在 4℃被抑制。中性缓冲液洗涤不会去除结合在转铁蛋白受体上的转铁蛋白。
4. 用 1ml 预冷的 pH2.0 缓冲液在 4℃孵育细胞 5min。去除 pH2.0 缓冲液，用预冷中性缓冲液洗涤细胞 2 次。
5. 每孔加入 1ml 增溶溶液并将溶解的细胞转移到适合于 γ 计数的试管中。用 1ml 水淋洗培养孔并合并入增溶溶液。
6. 用 γ 计数器测定每管中 ^{125}I 标记转铁蛋白（细胞内转铁蛋白）的量。
7. 用 SF 培养基洗涤另一块 6 孔板，弃洗涤液，细胞中加入新鲜 SF 培养基，在 37℃培养与步骤 2 相同的时间。
8. 将板冰置，并每次都用 2ml 预冷的中性缓冲液洗涤 3 次。
9. 将 1ml 预冷（4℃）的、含 3μg/ml ^{125}I 标记转铁蛋白（3μg/ml）和 1mg/ml BSA 的中性缓冲液加入 4 个孔（放射性总量孔）。将 1ml 含 200 倍浓度的未标记转铁蛋白的相同溶液加入另外 2 个孔（非特异性放射活性孔）。在 4℃孵育 2h 以测定细胞表面的受体量。
10. 将板冰置，并用 2ml/次预冷的中性缓冲液洗涤 6 次。
11. 溶解细胞，如步骤 5 和 6 测定每管中 ^{125}I 标记转铁蛋白量。
12. 用 4 个孔的放射活性总量平均值减去 2 个孔的非特异放射活性平均值来计算细胞内和表面转铁蛋白的特异性放射活性。算出表面/内部比值或者表面转铁蛋白量占总量的百分数。

基本方案 2　测量转铁蛋白内化作用动力学

转铁蛋白受体内化通过监测 ^{125}I 标记转铁蛋白的内化作用来测量。细胞用酸性 pH 缓冲液洗涤是为了从结合在细胞表面受体上的转铁蛋白中消除内化的转铁蛋白。

材料（带√项见附录 1）

感兴趣的细胞

√SF 培养基

^{125}I 标记的人二铁转铁蛋白（约 500cpm/ng；见支持方案 2）

未标记（非放射活性）人二铁转铁蛋白

√中性 pH 缓冲液，冰置冷却

√pH2.0 缓冲液，冰置冷却

增溶溶液：1%（w/v）Triton X-100 的 0.1mol/L NaOH 溶液

10mg/ml BSA

6 孔组织培养板

γ 计数器和试管

1. 实验前两天在含有 SF 培养基的 6 孔组织培养板（每个时间点一块，再加一块为稳定状态）中按 1×10^5 个/孔接种细胞。使得在实验当天细胞汇合率达到约 80%（约 5×10^5 个/孔）。
2. 实验当天，在特定时间点上用 2ml SF 培养基洗涤板中细胞 1 次，并在 SF 培养基中 37℃培养 1h。
3. 从单个 6 孔板开始，将 1ml 含饱和浓度（3μg/ml）^{125}I 标记转铁蛋白的 SF 培养基加入 4 个孔（放射性总量孔）中，将 1ml 含 ^{125}I 标记转铁蛋白以及 200 倍浓度的未标记转铁蛋白的 SF 培养基加入另外 2 个孔（非特异性放射活性孔）。培养板在 37℃培养设定的时间，通常是 2、4、6 和 8min（<10min）。
4. 从培养箱中取出培养板，置于冰上，用 2ml/次预冷的中性缓冲液洗涤 6 次。
5. 用 1ml/孔预冷的 pH2.0 缓冲液在 4℃孵育细胞 5min 以去除结合在表面的转铁蛋白，防止其再循环。
6. 取出并丢弃 pH2.0 缓冲液。用预冷（4℃）中性缓冲液洗涤细胞 2 次。
7. 剩余的时间点（稳态表面结合的培养板除外）则重复步骤 4 和 6。每个时间点都单独处理。
8. 每孔加入 1ml 增溶溶液，混匀使细胞溶解。将溶解的细胞转移到适合于 γ 计数的试管中。每次都用 1ml 水淋洗培养孔，合并入增溶溶液。
9. 用 γ 计数器测定每管中 ^{125}I 标记转铁蛋白的量（孵育过程中内化的转铁蛋白的量）。
10. 用 2ml SF 培养基洗涤稳态培养板。弃洗涤液，在新鲜 SF 培养基中 37℃培养 1h。
11. 将板冰置，并用 2ml/次预冷的中性缓冲液洗涤 3 次。
12. 将 1ml 预冷的含饱和浓度的 ^{125}I 标记转铁蛋白（3μg/ml）和 1mg/ml BSA 的中性缓冲液加入 4 个孔（放射性总量孔），将 1ml 含 200 倍浓度的未标记转铁蛋白的相同溶液加入另外 2 个孔（非特异性放射活性孔）。在 4℃孵育 2h 以测定细胞表面的受体量。
13. 将板冰置，并用 2ml/次预冷的中性缓冲液洗涤 6 次。
14. 溶解细胞，如步骤 8 和 9 测定 ^{125}I 标记转铁蛋白量。
15. 用 4 个孔的放射活性总量平均值减去 2 个孔的非特异放射活性平均值来计算细胞内和表面转铁蛋白的特异性放射活性。计算内部/表面转铁蛋白比值并对时间作图。

数据应该得到外推经过零点的一条直线，该直线的斜率内化速率常数。

备择方案 1　采用 ^{125}I 标记抗体测量膜蛋白内化作用动力学

对于未知配体的膜蛋白，针对胞外结构域的抗体可用于测量内化作用。对于这些实

验，采用^{125}I标记的针对胞外结构域抗体的 Fab 片段作为探针；这样可以防止交联并改变蛋白质的转运。Fab 片段采用 ImmunoPure Fab 制备试剂盒（Pierce）来制备，并用支持方案 2 进行标记。过量的未标记抗体用于测量非特异结合。

除了使用碘化 Fab 抗体片段而非^{125}I标记转铁蛋白外，其流程与基本方案 2 中描述的一样。有些抗体采用 pH2.0 缓冲液进行一次孵育从表面清除的效率不高，如果是这种情况，可以采用酸性/中性洗涤数个循环来增加清除效率。有些抗体抵制酸性清除，在这种情况下，可以用 1mg/ml 蛋白酶 K 或链霉蛋白酶 4℃孵育 30min（或更长时间）来释放表面结合的抗体。

备择方案 2　测量悬浮生长细胞的转铁蛋白内化作用动力学

补充材料（同见基本方案 2；带√项见附录 1）

感兴趣的悬浮培养物（如 K562 人红白血病细胞）

√HEPES 缓冲的 SF 培养基

pH2.0 培养基，冰置冷却：含有 25mmol/L 乙酸钠的细胞生长培养基配方（如 RPMI，DMEM），用 HCl 调节到 pH2.0

pH11.0 培养基，冰置冷却：含有 25mmol/L Tris 碱的细胞生长培养基配方（如 RPMI，DMEM），用 NaOH 调节到 pH11.0

1. 对于该测定，每个时间点采用约 1×10^5 个细胞（一般设 5 个时间点）。在所有时间点将这么多细胞有效地转移到 15ml 圆锥形离心管中。500g，室温离心 5min 沉淀细胞。
2. 吸去培养基，用 10ml HEPES 缓冲的 SF 培养基洗涤细胞一次，500g，室温离心 5min。在 10ml SF 培养基中 37℃孵育 30min 以再循环受体。
3. 500g，室温离心细胞 5min。用 0.8ml SF 培养基重悬细胞，置于 37℃。
4. 将 0.2ml 细胞悬液转移到一个微型离心管中，向 0.2ml 液滴中加入 0.6mg/ml 未标记转铁蛋白以测量非特异结合。将管置于 37℃水浴。
5. 对于 $t=0$，在含有 0.6ml 细胞悬液的 15ml 圆锥形离心管中加入 3μg/ml^{125}I标记转铁蛋白。将管置于 37℃。
6. 在正确的时间点（例如，1、2、3、4 和 5min），轻轻颠倒管子重悬 15ml 离心管中（仅含标记的转铁蛋白）的细胞。将 100μl 细胞悬液转移到一个冰上含 1ml 预冷中性缓冲液的 1.5ml 新管中。每个时间点重复该操作。
7. 在含有 0.2ml 细胞悬液和 0.6mg/ml 转铁蛋白（步骤 4）的管中加入 3μg/ml^{125}I标记转铁蛋白。将管置于 37℃。在正确的时间点（例如，2min 和 5min），颠倒管子重悬细胞，并将 100μl 细胞悬液转移到一个冰上含 1ml 预冷中性缓冲液的 1.5ml 新管中。第二个时间点重复该过程。
8. 用 1ml/次预冷中性缓冲液洗涤每个时间点 3 次。每次洗涤后 500g，4℃离心 5min。
9. 4℃用 0.2ml 预冷的 pH2.0 培养基孵育细胞 2min，以除去表面结合的转铁蛋白。加入 0.2ml 预冷的 pH11.0 培养基，使细胞到达中性 pH，重复离心。

10. 将上清液转移到适合于γ计数的试管中（表面放射活性）。用200μl水重悬细胞沉淀，并将其转移到另一个适合于γ计数的试管中（细胞内放射活性）。测定每管中^{125}I标记转铁蛋白的量。
11. 计算含有非特异放射性转铁蛋白的两个管中的平均表面放射活性（非特异表面放射活性）。从每个样品时间点的表面放射活性中减去该值，得到特异的表面放射活性。
12. 同样的，计算细胞内非特异平均放射活性，并从每个样品时间点的胞内放射活性中减去该值。
13. 最后的结果以胞内/表面标记的比值对时间作图。

基本方案3　测量转铁蛋白受体再循环的动力学

转铁蛋白受体从内体返回细胞表面的再循环过程可以通过测量释放到介质中的转铁蛋白量来测定。

材料（带√项见附录1）

感兴趣的细胞
√SF培养基
^{125}I标记的人转铁蛋白（见支持方案2）
未标记（非放射活性）人二铁转铁蛋白
√pH5.0缓冲液，37℃预热
√流出培养基，37℃预热
增溶溶液：1%（w/v）Triton X-100的0.1mol/L NaOH溶液
6孔组织培养板
γ计数器和试管

1. 实验前两天向含有SF培养基的6孔组织培养板中按1×10^5个/孔接种细胞。每个时间点准备一块板（通常为6个时间点），使得在实验当天细胞汇合率达到约80%。
2. 实验当天，用2ml SF培养基洗涤细胞。
3. 将1ml含饱和浓度（3μg/ml）^{125}I标记转铁蛋白的SF培养基加入4个孔（放射性总量孔）中。将1ml含饱和浓度的^{125}I标记转铁蛋白以及200倍浓度的未标记转铁蛋白的SF培养基加入另外2个孔（非特异性孔）。在37℃孵育一定时间，使转铁蛋白足以与转铁蛋白受体达到稳态结合。
4. 从培养箱中取出第一块培养板，用2ml SF培养基洗涤细胞，加入1ml预热（37℃）的pH5.0缓冲液，室温孵育2min。
5. 弃pH5.0缓冲液，室温下用预热（37℃）的流出培养基洗涤细胞3次，以促进结合在细胞表面受体上的转铁蛋白的释放，该过程在1min内完成。
6. 每孔加入1ml预热的流出培养基，在37℃孵育要求的时间（例如，对于CHO细胞，2.5、5、10、15、20和30min）。
7. 每个6孔板（即时间点）都重复步骤4和6。在确切的时间点，从培养箱中取出培养

板，将流出培养基转移到适合于γ计数的试管中。用1ml流出培养基洗涤细胞（快速），洗涤液合并入管中的流出培养基中。

8. 每孔加入1ml增溶溶液，混匀使细胞溶解。将溶解的细胞转移到适合于γ计数的试管中。每次都用1ml水淋洗培养孔，合并入增溶溶液。
9. 测定每管流出培养基和溶解细胞中的^{125}I标记转铁蛋白含量。
10. 对于每个时间点，通过减去两个孔的非特异放射活性平均值（非特异结合），从而修正每个流出培养基和增溶溶液管中的^{125}I标记转铁蛋白的放射活性。
11. 计算每个孔中细胞相关的转铁蛋白百分数和每个时间点4个数值的平均值，以细胞相关的转铁蛋白百分数对时间作图。

支持方案1　带金属离子的转铁蛋白

材料（带√项见附录1）

Apo-转铁蛋白（不带金属离子的转铁蛋白；有许多商业来源）
√PBS
1mg/m柠檬酸铁铵，溶于10mmol/L $NaHCO_3$/20mmol/L HEPES，pH7.7
PD-10柱（预装Sephadex G-25柱；Amersham Pharmacia Biotech）或任何其他的脱盐柱
0.2μm除菌滤器

1. 将200mg Apo-转铁蛋白（无金属离子）溶于6ml PBS中，加入4ml柠檬酸铁铵溶液。37℃孵育10min。
2. 孵育过程中，用PBS平衡5个预装PD-10柱。
3. 每个柱子上样2ml带金属离子的转铁蛋白。收集橙色产物（带金属离子的转铁蛋白），合并每个柱子的橙色组分。
4. 在280nm和465nm测定OD值。
5. 带金属离子的转铁蛋白用0.2μm滤膜过滤除菌，4℃可以保存6个月。

支持方案2　二铁转铁蛋白的放射性标记

警告：该过程必须在放射性碘许可的区域内操作。所有操作碘反应或使用放射性物质的人员都必须经过正确的培训。

材料（同见基本方案1；带√项见附录1）

√PBS
人二铁转铁蛋白（见支持方案1）
37MBq/ml Na^{125}I（100mCi/ml；NEN生命科学产品）
4mg/ml氯胺T，溶于PBS（新鲜制备）
8mg/ml重亚硫酸钠，溶于PBS（新鲜制备）

1mg/ml BSA

100% (w/v) 三氯乙酸 (TCA)

接种细胞 5×10^5 个/孔的 6 孔组织培养板 (见基本方案 1, 步骤 1)

PD-10 柱 (预装 SephadexG-25 柱; Amersham Pharmacia Biotech) 或任何其他的脱盐柱

1. 用 3 个床体积的 PBS 平衡 PD-10 柱。
2. 向含有 1mCiNa^{125}I 的小管中加入 0.2ml 含 2mg 人二铁转铁蛋白的 PBS 溶液, 上下吹吸混匀。
3. 加入 25μl 新鲜配制的 4mg/ml 氯胺 T 的 PBS 溶液, 上下吹吸混匀。在该区域内孵育 2min。
4. 终止反应: 加入 25μl 新鲜配制的 8mg/ml 重亚硫酸钠 PBS 溶液, 上下吹吸混匀。
5. 将溶液转移到平衡的 PD-10 柱, 收集 1ml 的组分。
6. 每个组分的 10μl 等份用于测量放射活性。
7. 为了确定排出组分的量是^{125}I 标记的蛋白质, 用 100μl 1mg/ml BSA 溶液稀释每个组分的 10μl 等份。加入 15μl 100%TCA, 混匀, 4℃孵育 30min。室温下, 样品在微型离心机中以最大速度离心 10min。分别测定上清和沉淀中的放射活性。
8. 测定特异活性 (每纳克蛋白质的放射活性; 通常为 300~500cpm/ng)。
9. 将 6 孔板中的细胞 (5×10^5 个/孔) 冷却到 4℃, 用 2ml 预冷中性 pH 缓冲液洗涤每个孔。每个样品中加入 3μg/ml^{125}I 标记转铁蛋白和不同量的未标记转铁蛋白, 在 SF 培养基中 4℃孵育 2h。
10. 用 2ml 中性 pH 缓冲液 (4℃) 洗涤细胞。
11. 溶解细胞, 测定细胞相关的放射活性 (详见基本方案 1, 步骤 5 和 6)。

    超过 200 倍浓度的未标记转铁蛋白可将^{125}I 标记转铁蛋白结合减少到小于 10%。
12. 放射性碘化转铁蛋白在 4℃铅盒中可以保存 1 个月。

基本方案 4　测量液相摄取

材料 (带√项见附录 1)

感兴趣的细胞

√SF 培养基

5mg/ml 辣根过氧化物酶 (HRP), 溶解于 SF 培养基中

√中性 pH 缓冲液, 冰置冷却

0.01% (w/v) TritonX-100

6 孔组织培养板

1. 实验前两天在含有 SF 培养基的 6 孔组织培养板中按 1×10^5 个/孔接种细胞。每个时间点使用 3 个孔。使得在实验当天细胞汇合率达到约 80%。
2. 用 2ml SF 培养基洗涤细胞一次, 并在含 5mg/ml HRP 的 SF 培养基中 37℃培养不同

时间（例如，5、10、15、20、30 和 60min）。
3. 在正确的时间点，从培养箱中取出培养板，置于冰上，用 2ml/次预冷中性 pH 缓冲液洗涤 6 次。
4. 用 1ml 0.01%（w/v）TritonX-100 裂解细胞。取 100μl 等份，采用比色法（Steinman et al. 1976）测量裂解液中的 HRP 活性。测量 5mg/ml HRP 溶液的 HRP 活性作为校正标准。
5. 测量裂解液中的蛋白质含量（附录 3A 或 3B）。
6. 将每个孔的结果整理成相对于总蛋白量的 HRP 量（即 ngHRP/mg 细胞蛋白质）。计算每个时间点这些数值的平均值并对时间作图得出相应函数。

支持方案 3　通过撤除钾离子来抑制网格蛋白介导的内吞作用

所有内吞机制都是能量和温度依赖的，4℃时被阻断。

材料（带√项见附录 1）

感兴趣的细胞（例如，人和鸡胚胎成纤维细胞，Hep2 细胞）
√SF 培养基
低渗培养基：1∶1（v/v）SF 培养基/水
K^+ 撤除缓冲液：100mmol/L NaCl/50mmol/L HEPES，pH7.4
6 孔组织培养板

1. 实验前两天在含有 SF 培养基的 6 孔组织培养板中按 1×10^5 个/孔接种细胞，使得在实验当天细胞汇合率达到约 80%（约 5×10^5/孔）。每个时间点准备一块板，另加一块用于表面标记。
2. 实验当天，用 2ml SF 培养基洗涤细胞一次。在 2ml 低渗培养基中 37℃孵育 5min。
3. 用 2ml K^+ 撤除缓冲液洗涤细胞。在 K^+ 撤除缓冲液中 37℃培养 30min。
4. 如前所述（见基本方案 2，步骤 3～15，或见备择方案 2）测量内化作用，不过是使用 K^+ 撤除缓冲液进行内化孵育。

支持方案 4　通过胞质酸化来抑制网格蛋白介导的内吞作用

材料（带√项见附录 1）

感兴趣的细胞
√SF 培养基
添加 25mmol/L NH_4Cl 的 SF 培养基
140mmol/L KCl/1mmol/L 咪吡嗪/40mmol/L HEPES，pH7.0
6 孔组织培养板

1. 实验前两天在含有 SF 培养基的 6 孔组织培养板中按 1×10^5 个/孔接种细胞，使得在

实验当天细胞汇合率达到约 80%（约 5×10^5/孔）。每个时间点准备一块板，另加一块用于表面标记。

当实验在 CO_2 培养箱中进行时采用重碳酸缓冲介质；当实验在空气中操作时采用 HEPES 缓冲介质。

2. 实验当天，用 2ml SF 培养基洗涤细胞一次。在添加 25mmol/L NH_4Cl 的 SF 培养基中 37℃孵育 30min。
3. 在 140mmol/L KCl/1mmol/L 咪吡嗪/40mmol/L HEPES，pH7.0 中 37℃ 培养 2min。
4. 如前所述（见基本方案 2，步骤 3～15，或见备择方案 2）测量内化作用，不过是使用含咪吡嗪的缓冲液进行内化孵育。

参考文献：Dautry-Varsat et al.，1983；Mellman，1996；Mukherjee et al.，1997

撰稿人：Timothy E. McGraw and Agathe Subtil

单元 10.3　蛋白质转运到质膜

许多膜整合蛋白在内质网（ER）上合成，最后到达细胞表面与细胞周围环境相接触。蛋白质在从 ER 中运出，转运通过高尔基体次级囊腔和高尔基体反面网络结构（TGN）的过程中，可能经历了许多翻译后修饰，这些会影响分子质量和/或电荷。这些变化可以作为测量蛋白质到达细胞表面的情况。

警告：当进行放射性操作时，采取正确的防护措施以避免污染实验者和周围环境。在正确指定的区域内进行实验以及处理废物，按照当地放射性安全官员提供的指导进行。

基本方案　采用唾液酸酶消化测定到达细胞表面

该测定方法基于一个事实：在 TGN 中，糖蛋白的 *N*-和 *O*-连接糖链末端需要一个或多个唾液酸残基。

材料（带√项见附录 1）

细胞
含 8%～10%（v/v）FBS 的无氨基酸培养基
放射性标记的氨基酸
√PBS，冰置冷却
含 1mmol/L $CaCl_2$ 的 PBS
V 型唾液酸酶，来源于 Clostridium perfringens（Sigma），溶于 PBS，按 1～10 U/ml分装成 10μl 等份，可以保存在－20℃数年
含 10%（v/v）胎牛血清（FBS）的 PBS
√裂解混合物

胎球蛋白

1. 在含 8%～10%（v/v）FBS 的无氨基酸培养基中培养细胞。用约 50μCi 放射性标记氨基酸脉冲标记，每个样品约 5×10^5 个细胞，追踪不同时间（单元 8.1）。对于早期事件可以采用追踪时间为：0、1、2、3、5、10 和 30min，对于随后胞内的大部分阶段可采用追踪时间为：0、15、30、60、120 和 240min。每个追踪时间点标记两组细胞：一个用于唾液酸酶处理，另一个作为对照样品。

2a. 对于非贴壁细胞：在每个追踪点用低速离心（1500*g*，4℃，3min）收集非贴壁细胞。

2b. 对于贴壁细胞：在每个追踪点用含 10mmol/L EDTA 的 PBS 溶液，低于 15℃（终止胞内运输）使细胞从培养板解离，收集之。

3. 用 1ml PBS 于 4℃洗涤细胞 2 次。两次洗涤中间 1500*g*，4℃离心 3min 收集非贴壁细胞或解离的细胞。加入 PBS 前轻轻拍打管底使沉淀重悬。

4. 对照样品加入 100μl 含 1mmol/L $CaCl_2$ 的 PBS，另一样品加入 100μl 含 1mmol/L $CaCl_2$ 和 0.1IU 唾液酸酶的 PBS 重悬上一步骤得到的沉淀。细胞冰置 1h。

5. 用 1ml 含 10%FBS 的 PBS 洗涤细胞 3 次以去除唾液酸酶。

6. 用 1ml 含 1～10μg 胎球蛋白（抑制后期裂解唾液酸作用）的裂解混合物裂解细胞。

7. 为了确保从等量标记细胞中分离蛋白质，用 TCA 沉淀 10μl 每个细胞裂解液来测量每个裂解液中未结合的放射活性（单元 8.1）。

8. 用免疫沉淀反应从等量放射活性的裂解液中分离蛋白质（单元 8.5）。

9. 用 SDS-PAGE（单元 7.1）或者一维 IEF（见支持方案 2），然后是放射自显影（单元 7.8）分析免疫沉淀。

备择方案　通过细胞表面分子的生物素化来测量到达细胞表面

生物素化的表面蛋白引入了带有单价、水溶性交联臂的生物素基团，使其可以采用偶联抗生物素蛋白或链亲和素的 Sepharose 进行分离。唯有质膜表面的蛋白质才可作为该反应的底物，因为该反应需要在低于 15℃的温度下进行。新合成的蛋白质到达细胞表面可以通过脉冲-追踪方案（单元 8.1）后使细胞生物素化来分析。

材料（带√项见附录 1）

细胞
洗涤缓冲液：含 1mmol/L $MgCl_2$ 和 0.1mmol/L $CaCl_2$ 的 PBS（见配方）
15 mg/ml 硫代-*N*-羟基琥珀酰亚胺-生物素（硫代-NHS-生物素；Pierce），溶于 PBS，使用前新鲜配制
含 25mmol/L HCl·赖氨酸的洗涤缓冲液
含 50mmol/L 甘氨酸的裂解缓冲液
0.5%SDS
√50mmol/L Tris·Cl，pH7.5
针对感兴趣蛋白质的特异性抗体

抗生物素-或链亲和素-Sepharose 珠子

1. 进行脉冲-追踪实验（见单元 8.1）。
2. 在各个追踪时间点，每个样品或培养皿都用洗涤缓冲液小心洗涤 3 次。用小体积（足够覆盖细胞）的含终浓度为 1mg/ml 硫代-NHS-生物素的洗涤缓冲液在 4℃孵育细胞 30min。
3. 用含 25mmol/L HCl·赖氨酸的洗涤缓冲液洗细胞两次。用适当的含 50mmol/L 甘氨酸的裂解缓冲液裂解细胞。

   裂解缓冲液通常还含有 TritonX-100；但是当使用辛基糖苷、洋地黄皂苷或 CHAPS（例如，见裂解混合物配方）时会发生不稳定的相互作用。
4. 如上所述（见基本方案 1，步骤 7）测量放射活性。从等量的 TCA 可沉淀的放射活性溶液中免疫沉淀（单元 8.5）感兴趣的蛋白质。
5. 将免疫沉淀平均分成两份。一份在免疫沉淀后直接用 SDS-PAGE（单元 7.1）分析。
6. 另一份在 100μl 0.5%SDS 中煮沸 5min 变性。加 900μl 50mmol/L Tris·Cl，pH7.5 稀释 SDS。10 000g，4℃离心 5min。上清转移到一个新的微型离心管。加入约 10μl 压缩的抗生物素-或链亲和素-Sepharose 珠子对生物素化蛋白溶液进行免疫分离，得到上清液和沉淀。用 SDS-PAGE（单元 7.1）分析。

参考文献：Neefjes et al.，1990

撰稿人：Jacques Neefjes

单元 10.4　极化上皮细胞中的膜转运

空间不对称性是大多数真核细胞的结构和功能的基础。这种极性的基本方面是细胞质膜被分割成不连续的区域。上皮细胞具有一个面向外界的顶端表面和与相邻细胞和下方结缔组织接触的基底外侧表面。上皮细胞通过两条途径将蛋白质运输到细胞表面。新合成的蛋白质可以直接穿过高尔基体反面网络结构（TGN）到达顶端或基底外侧表面。除此之外，蛋白质可以被运输到基底外侧表面，然后通过内吞作用和胞吞转运到顶端表面。表 10.4.1 总结了极化上皮细胞膜转运研究中最常用的细胞系。

表 10.4.1　极化上皮细胞膜转运研究中常用的细胞系

细胞系	来源	注释	ATCC#[a]
MDCK	犬肾	最常用。虽然许多克隆具有特异的表型，但它主要有两类，I 型和 II 型	CCL-34
Caco-2	人肠	虽然派生自人直肠癌，但是更类似小肠。生长缓慢	HTB-37
FRTL	大鼠甲状腺	有别于其他上皮细胞，在其基底外侧表面发现了一些糖脂和 GPI-锚定蛋白	CRL-1468

a. ATCC 主页是：http：//www.atcc.org.

警告：当进行放射性操作时，采取正确的防护措施以避免污染实验者和周围环境。在

正确指定的区域内进行实验以及处理废物，按照当地放射性安全官员提供的指导进行。

注意：所有需要接触细胞的溶液和仪器都必须灭菌，按要求正确使用灭菌技术（如使用无菌区域）。所有培养（除了特殊要求的）都应该在湿润的、37℃、5%CO_2的培养箱中进行。某些培养基（如DMEM）需要改变CO_2浓度以维持pH。

基本方案1　转染极化上皮细胞悬液和选择抗性克隆

材料（带√项见附录1）

10cm组织培养皿中汇合培养的细胞

√HEPES缓冲盐（HeBS），pH7.05

20μg质粒DNA，溶于1～20μl水

2mol/L $CaCl_2$：过滤灭菌，4℃可保存6个月

√CMF-DPBS

√胰蛋白酶/EDTA溶液［如0.25%（w/v）胰蛋白酶/0.2%（w/v）EDTA］

√MEM含有或不含5%（v/v）FBS的MEM培养基

20mmol/L氯喹水溶液：过滤灭菌，4℃可保存6个月

15%（w/v）甘油HeBS溶液：过滤灭菌，4℃可保存6个月

选择培养基：含真核抗生素（如G418；见配方）的MEM/5%FBS

未转染的细胞

10cm培养皿

1. 在转染前一天按1∶10将细胞传代至10cm培养皿中，使得转染时细胞汇合率达到约30%。
2. 在0.5ml HEPES缓冲盐（HeBS），pH7.05中加入含20μg质粒DNA的1～20μl水溶液和31μl 2mol/L $CaCl_2$。轻弹小管20s。在室温下孵育质粒30min，此间样品避免任何不必要的晃动。
3. 用CMF-DPBS洗涤10cm次级汇合培养皿（即约30%汇合率或约1×10^7个细胞），然后加入1～2ml胰蛋白酶/EDTA溶液消化细胞。
4. 300g，室温离心细胞3min。用5ml含5%FBS的MEM培养基重悬。转移1ml细胞悬液到一个10cm皿中。
5. 一边轻摇10cm皿，一边缓慢加入500μl DNA-Ca^{2+}的共沉淀（步骤2）。室温孵育15～20min。
6. 向3.5ml MEM/5%FBS中加入50μl 20mmol/L氯喹。将该MEM/FBS/氯喹混合物加入培皿中，晃动分散细胞。37℃培养6～18h（如过夜），使细胞贴壁。
7. 去除培养基。用含氯喹的培养基（见步骤6）洗涤1次。轻轻加入2ml 15%甘油HeBS溶液，37℃培养1min（严格定时）。
8. 用不含FBS的MEM轻轻洗涤2次以清除甘油，然后加10ml MEM/5%FBS。细胞在37℃培养2～3天直至长满。
9. 消化细胞（步骤3），用10ml选择培养基重悬。用未转染细胞作对照。

10. 将细胞以 7 个不同稀释度加入 10cm 皿：

细胞悬液（ml）	0.025	0.05	0.1	0.2	0.4	0.8
选择培养基（ml）	9.975	9.95	9.9	9.8	9.6	9.2

晃动使细胞均匀分布。

11. 37℃培养细胞 16～21 天（即长大至克隆足以挑出），每 4～6 天加入新鲜的选择培养基。
12. 尽可能地从最高稀释倍数的培养皿中挑取克隆。

支持方案 1　挑取稳定转染的克隆

材料（同见基本方案 1；带√项见附录 1）

10cm 皿中在选择培养基中生长约 16d、稀释的转染和未转染的细胞（见基本方案 1）
√无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 DPBS（CMF-DPBS）
中号玻璃克隆环，无菌（Bellco Glass）
0.5%（w/v）SDS 裂解缓冲液
12%（w/v）CL-2B 珠子悬液
12 孔组织培养皿

1. 检查 10cm 皿中在选择培养基中生长约 16 天、稀释的转染和未转染的细胞，寻找单个克隆。在单个克隆对应的培养皿外侧底部画圈作为标记。
2. 用 10ml CMF-DPBS 洗涤培养皿。
3. 把巴斯德吸管装在真空装置上，在单个克隆周围吸出一个“干”环（即避免液体）。
4. 将无菌的中号玻璃克隆环置于克隆周围，加入胰蛋白酶/EDTA 溶液直至充满克隆环。对于所有要挑的克隆（15～50 个）重复步骤 3 和 4。
5. 所有克隆环放好之后，室温下在无菌区孵育约 20min。
6. 取出含有松散细胞的胰蛋白酶液，加入到 12 孔组织培养板的孔中（即每个孔加一个克隆），每孔加 2ml 选择培养基。所有克隆都重复该操作。
7. 上下吹吸数次重悬细胞。每个孔都转移 1ml 到新 12 孔板的对应孔中（一块板用于收集蛋白质，另一块用于克隆扩增）。37℃培养到铺满（即约 5～7 天）。
8. 向用于收集蛋白质的板中加入 500μl 0.5%SDS 裂解缓冲液，样品在 100℃煮 5min。涡旋振动样品 10min。样品中加入 20μl 12%CL-2B 珠子悬液进行预处理。混匀数次，在最大速度作短暂离心。收集上清液，取一份样品用于 SDS-PAGE（单元 7.1）和免疫印迹（单元 7.7）。
9. 对于发现有表达的克隆，用第二个等同的孔扩增细胞。

支持方案 2　在滤器上培养上皮细胞

材料（同见基本方案 1 和支持方案 A1）

10cm 皿汇合生长的上皮细胞（表 10.4.1）

12mmTranswell 滤器和合适的培养皿（表 10.4.2）

IEC 临床离心机，带 12×15 转子

表 10.4.2　可用于培养上皮细胞的商业化滤器

材料	制造商	注释
聚碳酸酯	Corning Millipore BD Bioscience Labware Nalge Nunc International	应用最广泛
PTFE/FP	Millipore Corning BD Bioscience Labware	良好的光学特性。常需要用细胞外基质（ECM）包被；可以购买预包被的产品
PET	BD Bioscience Labware	有不同的孔密度，低密度的具有更好的光学特性但是多孔性较低。供应数种 ECM 预包被的产品
Anopore	Nalge Nunc International	自身荧光很低，非常适合免疫荧光显微术
纤维素酯	Millipore	蛋白质结合多
聚酯	Corning	良好的光学特性

1. 用 10ml CMF-DPBS 洗涤 10cm 培养皿中的汇合生长上皮细胞。
2. 加 3ml 胰蛋白酶/EDTA 溶液（例如，对于 MDCK 细胞用 0.25%胰蛋白酶/0.2% EDTA），37℃孵育 15min。轻拍培养皿搅动细胞，当所有细胞都解离后，加 8ml MEM/5%FBS。
3. 转移到合适的管中，300*g* 室温离心细胞 3min。弃上清。
4. 用 10ml MEM/5%FBS 重悬细胞，上下吹吸约 10 下使充分混匀。加 0.5ml 该溶液（细胞浓度约 2.5×10^5 个/孔）到 12mmTranswell 滤器（图 10.4.1）的顶部培养室（即内部）。然后再加 0.4ml MEM/5%FBS 到顶部培养室使总体积为 0.9ml。

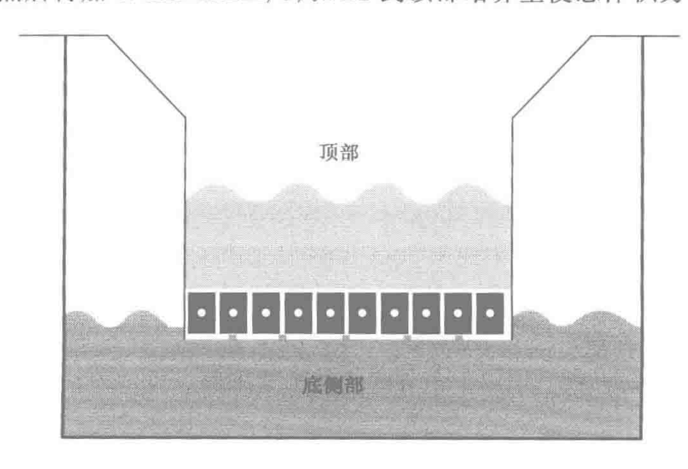


图 10.4.1　极性上皮细胞在 Transwell 中生长的示意图

细胞是带小白圈（代表细胞核）的黑色矩形。顶部和底部培养基为灰色。如支持方案 3 中描述，顶部培养基的液面比底部外侧培养基的高

5. 加 1ml MEM/FBS 到底部培养室（即 Transwell 滤器的周围区域）。37℃培养，每天更换 1ml 顶部和 1ml 底部外侧的培养基，培养 3～5 天直至形成紧密的单细胞层（见支持方案 3）。

重要注意事项： 先去除底部培养基然后再去除顶部培养基，之后以相反的顺序加新鲜培养基。如果底部有培养基而顶部没有的话，细胞可能会离开滤器。

支持方案 3　测量生长在滤器上的单层细胞的泄漏

补充材料（同见支持方案 2）

连接在真空系统上的巴斯德吸管

1. 如前所述（见支持方案 2），在滤器上培养细胞。实验前一天（即通常在滤器上生长 3～6 天后），向顶部孔中加入正常细胞培养基至满得溢出。
2. 用无菌的连接于真空系统上的巴斯德吸管从底部外侧培养室吸出大部分培养基，仅使留下的部分足以与滤器整个底部表面接触。Transwell 滤器（依然在多孔板中）在 37℃孵育过夜（通常为 8～16h）。
3. 通过估计顶部培养室中的液面在过夜培养中是否改变来测定单层细胞的紧密性。

基本方案 2　极化上皮细胞中的脉冲-追踪实验

材料（带√项见附录 1）

在 12mmTranswell 滤器上生长 4～7 天的上皮细胞（见支持方案 2）
√Dulbecco 磷酸缓冲盐（DPBS）
饥饿培养基：不含放射性追踪氨基酸的 MEM 培养基（见配方）
放射性氨基酸（例如，1175Ci/mmol ^{35}S 甲硫氨酸）
MEM 培养基
√0.5%（w/v）SDS 裂解缓冲液
封口膜
湿盒：塑料盒，装有 2 个活性炭袋子和一块湿润的 Whatman 滤纸
12 孔 Transwell 组织培养皿（表 10.4.2）
磷屏成像仪
手术刀

1. 在 12mmTranswell 滤器上生长了 4～7 天的上皮细胞，用 37℃的 Dulbecco 磷酸缓冲盐（DPBS）洗涤 3 次。在顶部和底部外侧各加 500μl 饥饿培养基，37℃、5%CO_2 培养 15min。
2. 在湿盒内的封口膜上点 25μl 放射性氨基酸（例如，4μl 1175Ci/mmol ^{35}S 甲硫氨酸和 21μl 饥饿培养基）。

湿盒是一个塑料盒，里面放有两袋活性炭，附在盒子内表面顶部，用来捕获烟雾

化的^{35}S甲硫氨酸。盒子底部用一张浸在水中的Whatman滤纸覆盖，以防止细胞干枯。封口膜放置在滤纸之上。

3. 除去底部培养基而保留顶部培养基。小心地将滤器放置在液滴上使细胞底部外侧暴露在放射性氨基酸中。37℃孵育15～20min（即使标记进行）。分析被标记的蛋白质。
4. 准备含有新鲜MEM培养基的12孔新板。将Transwell转移到新板中，用37℃的DPBS从顶部和底部外侧洗涤细胞3次。加入MEM培养基：顶部300μl，底部外侧500μl。37℃孵育预设的追踪时间（如1h）。
5. 收集顶部培养基。将Transwell转移到新12孔板中，收集底部外侧培养基。
6. 将等分的顶部和底部外侧培养基上样到适当的凝胶上，电泳（第7章）分析，并用磷屏成像仪测定放射活性量（单元7.8）。
7. 用手术刀切下滤膜，收集细胞。将滤膜置于500μl 0.5%SDS裂解缓冲液中裂解细胞。
8. 通过用合适的凝胶（单元7.1）及磷屏成像（单元7.8）分析等分裂解液，测定细胞内蛋白质放射活性量。

基本方案3　新合成上皮细胞表面蛋白的生物素化

这个方案的目的是采用放射标记氨基酸追踪分子结合硫代-NHS-生物素（外源的细胞表面标志）来研究上皮细胞新合成的顶部和基底外侧表面蛋白质的转运。

材料（带√项见附录1）

放射标记氨基酸
在12mm Transwell滤器上生长4天的上皮细胞（见支持方案2）
√Hank平衡盐溶液（HBSS），4℃
20mg/ml硫代-NHS-生物素（Pierce），溶于无水DMSO，使用前新鲜配制
√10mmol/L Tris缓冲盐，pH7.4（TBS）
√0.5%（v/v）SDS裂解缓冲液
√2.5%（v/v）Triton稀释缓冲液
蛋白A-Sepharose珠子，带或不带兔抗鼠的单克隆抗体或兔多克隆抗体
链亲和素珠子（如Pierce）
√混合的胶束洗涤缓冲液
√终末洗涤缓冲液
5%（v/v）SDS
√2×上样缓冲液
平板摇床
旋转振荡器（如Bellco）
磷屏成像仪

1. 根据脉冲-追踪实验（见基本方案2，步骤1～3）所描述的，在12mm Transwell滤

器上生长了4天的上皮细胞中加入放射标记氨基酸，标记15min。除去培养基，用冷HBSS洗涤细胞3次。

2. 使用前准备20mg/ml硫代-NHS-生物素（溶于无水DMSO），再用HBSS按1∶100稀释到终浓度为200μg/ml。从顶部加400μl或从底部外侧加800μl到细胞中。平板摇床上，4℃孵育30min。
3. 除去生物素溶液，用10mmol/L Tris缓冲盐洗涤5次。
4. 切下滤膜，放置于一个含500μl 0.5%SDS裂解缓冲液的微型离心管中。煮沸5min，涡旋振荡15min，13 000r/min离心5min。上清液转移到新的微型离心管。
5. 加入等体积2.5%Triton稀释缓冲液，使终浓度为0.25%SDS裂解缓冲液/1.25%Triton稀释缓冲液。
6. 加入4μl不带抗体的蛋白A-Sepharose珠子，在旋转振荡器上，4℃预处理30min。13 000r/min，4℃离心20min。上清液转移到新的微型离心管。
7. 加入用兔抗鼠的单克隆抗体或兔多克隆抗体预包被的蛋白A-Sepharose珠子（终浓度为10mg/ml），4℃孵育12h。
8. 用等量0.5%SDS和2.5%Triton稀释缓冲液封闭链亲和素珠子，孵育1～2h。
9. 用混合的胶束洗涤缓冲液洗涤蛋白A-Sepharose-抗体复合物3次，终末洗涤缓冲液洗涤1次——先用缓冲液稀释，再离心。
10. 将珠子置于40μl 5%（v/v）SDS中煮5min，以回收免疫沉淀的生物素化的抗原。加460μl0.5%SDS和2.5%Triton稀释缓冲液稀释，13 000r/min离心1min。上清液转移到新的微型离心管。
11. 加入13μl链亲和素珠子（即每个滤膜13μl），在旋转振荡器上，4℃免疫沉淀过夜。
12. 如上所述（步骤9），用混合的胶束洗涤缓冲液洗涤链亲和素-珠子-抗体复合物3次，终末洗涤缓冲液洗涤1次。
13. 加8μl 2×上样缓冲液，煮沸5min，用变性SDS凝胶电泳（单元7.1）分析。
14. 根据产品说明书检测磷屏成像数。

基本方案4　极化上皮细胞蛋白的间接免疫荧光分析

材料（带√项见附录1）

在12mm Transwell滤器上生长5～7天的细胞（见支持方案2）
√DPBS，冰置预冷
16%或40%（w/v）多聚甲醛
√淬灭溶液，新鲜
√促渗溶液，新鲜
一抗
荧光标记的二抗
DPBS/0.1%（v/v）Triton：250μl20%（v/v）Triton加入49.75ml DPBS（见配方），4℃可保存6个月
抗衰退封固溶液

金属板

旋转振荡器（如 Bellco）

湿盒：塑料盒，装有一张湿润的 Whatman 滤纸

铝箔

手术刀

倒置荧光显微镜，带有合适的载玻片和盖玻片

1. 将 12mm Transwell 滤器上生长了 5～7 天的细胞放置在冰上的金属板上冷却。
2. 用冰冷 DPBS 稀释 16%或 40%的多聚甲醛储备液制备 4%（v/v）多聚甲醛。
3. 用 1ml 冰冷 DPBS 洗涤 Transwell 滤器的顶部和底部 2 次。
4. 在底部和顶部表面加入 0.5ml 4%多聚甲醛 DPBS 溶液，固定细胞。置于冰上的容器中，在缓慢旋转（例如，Bellco Glass 旋转振荡器设置 3）的旋转振荡器上孵育 20min。
5. 用 1ml DPBS 洗涤 Transwell 滤器 3 次，以除去多聚甲醛。
6. 顶部和底部都加 1ml 新鲜的淬灭溶液，室温下缓慢旋转 10min。
7. 用 1ml DPBS 洗涤 1 次。
8. 顶部和底部都加 1ml 新鲜的促渗溶液，37℃水浴孵育 15min。
9. 用促渗溶液按适当比例（如 1∶100）稀释一抗至 150μl。以 40μl 为一滴加在湿盒内的封口膜上，将 Transwell 滤器放在液滴上（即从底部加入），并加 110μl 到 Transwell 滤器的上表面。37℃，旋转振荡器上孵育 1h。
10. 将 Transwell 滤器移回培养板。用 1ml 促渗溶液洗涤 4 次，每次都在旋转振荡器上孵育 5min。
11. 用促渗溶液按 1∶100（通常）稀释荧光标记的二抗，像一抗溶液（见步骤 9）一样加到滤器上。用铝箔包裹湿盒，37℃平板摇床上孵育 30min。
12. 样品避免光照，用 1ml 促渗溶液洗涤 4 次，每次都在旋转振荡器上孵育 5min。用 1ml DPBS 淋洗 1 次。用 1ml DPBS/0.1% Triton 洗涤 2 次，每次 3min。用 1ml DPBS 淋洗 1 次。
13. 用 4%多聚甲醛 DPBS 溶液后期固定细胞，室温 15min（见步骤 4）。用 1ml DPBS 淋洗 1 次。
14. 用手术刀切下滤膜，细胞面朝上将其放在加有一滴防淬灭剂的载玻片上。盖上盖玻片，暗处室温干燥过夜。
15. 在倒置荧光或共聚焦显微镜下观察，确定所感兴趣的细胞的定位。如果必要，保存在－20℃暗处以防止荧光基团淬灭。

参考文献：Drubin and Nelson，1996；Luton and Mostov，1999；Mostov et al.，2000

撰稿人：Joshua H. Lipschutz，Lucy Erin O' Brien，Yoram Altschuler，Dana Avrahami，Yen Nguyen，Kitty Tang and Keith E. Mostov

（赵永娟　译）

第 11 章　细胞增殖、细胞衰老和细胞死亡

为了研究细胞周期有关的问题，细胞的周期状态的明确标记显得非常重要。由于有丝分裂伴随清楚的形态学改变，所以确定细胞的间期状态时需要生物化学标记。由于染色体 DNA 复制发生在 S 期，因此可以通过测量 DNA 中掺入核苷类似物（如溴脱氧尿苷，BrdU）的能力来直接分析细胞是否处于 S 期（单元 11.3）。DNA 含量可以作为一个通用的诊断标记，用于判断细胞是否正在进行 S 期的 DNA 复制（此时 DNA 含量加倍）或者 M 期的细胞分裂（此时 DNA 含量减少一半）。DNA 含量也可以用流式细胞术的分析来监测（单元 11.1）。最后，由于不同的 CDK 在细胞周期的不同时期被激活，所以 CDK 家族成员的活性也可作为诊断细胞所处细胞周期状态的明确标记（单元 11.3 中也有讨论）。组合的方法，即通过流式细胞术同时监测细胞内周期蛋白亚基的丰度和 DNA 的含量，可用于更详细的描述细胞周期状态（单元 11.1 中也有讨论）。

获得细胞周期状态均一的细胞群体的能力对于细胞周期研究而言也很重要。可以通过调控培养细胞的营养状态或用抑制剂阻断它们进入 S 期或有丝分裂进程（单元 11.2）。另外，利用细胞在有丝分裂过程中与细胞培养器皿的附着力减弱的现象，可以通过“有丝分裂震脱”的方法获得 M 期细胞（单元 11.2 中也有讨论）。由于指数生长培养细胞中在指定时间内处于有丝分裂的细胞仅占相对小的比例，有丝分裂震脱常常与一些抑制剂处理或营养调控联合使用。营养调控或药物处理使细胞长时间处于停滞状态，往往会扰乱它们的代谢。在不需要细胞均一的情况下，则可以利用细胞大小直接与细胞周期时期相关的事实。

细胞死亡可以以程序性（细胞凋亡）或非程序性死亡的（坏死）方式发生。细胞凋亡和坏死可以用多个标准，包括细胞形态学和 DNA 片段化模式来区分（单元 11.4）。细胞凋亡通常是多细胞有机体偏爱的细胞死亡方式，因为它是一种更有序的细胞结构的分解和细胞大分子组分的降解，因此几乎不会引起周围细胞的损伤。许多刺激都可以引起细胞凋亡，包括发育信号、细胞死亡刺激受体的接合、DNA 损伤或内质网中存在大量未折叠蛋白质。这些通路最终导致半胱天冬酶（caspase）——在导致细胞内含物片段化和细胞死亡的蛋白质裂解级联反应中起作用的相关蛋白酶组成的家族——的活化。作为细胞凋亡标记的半胱天冬酶活化的分析将在单元 11.5 中讨论。

参考文献：Hartwell and Weinert，1989；Murray and Hunt，1993

撰稿人：Mary Dasso

单元 11.1 用流式细胞术确定细胞周期阶段

测量细胞内 DNA 的含量可以使人们区分处于细胞周期中 $G_{0/1}$ 期，还是 S 期，还是 G_2/M 期的细胞（图 11.1.1）。DNA 通常用荧光染料染色，然后用流式、成像或激光扫描细胞术测量细胞荧光。最常用于该目的的染料的光谱特征列于图 11.1.2 中。

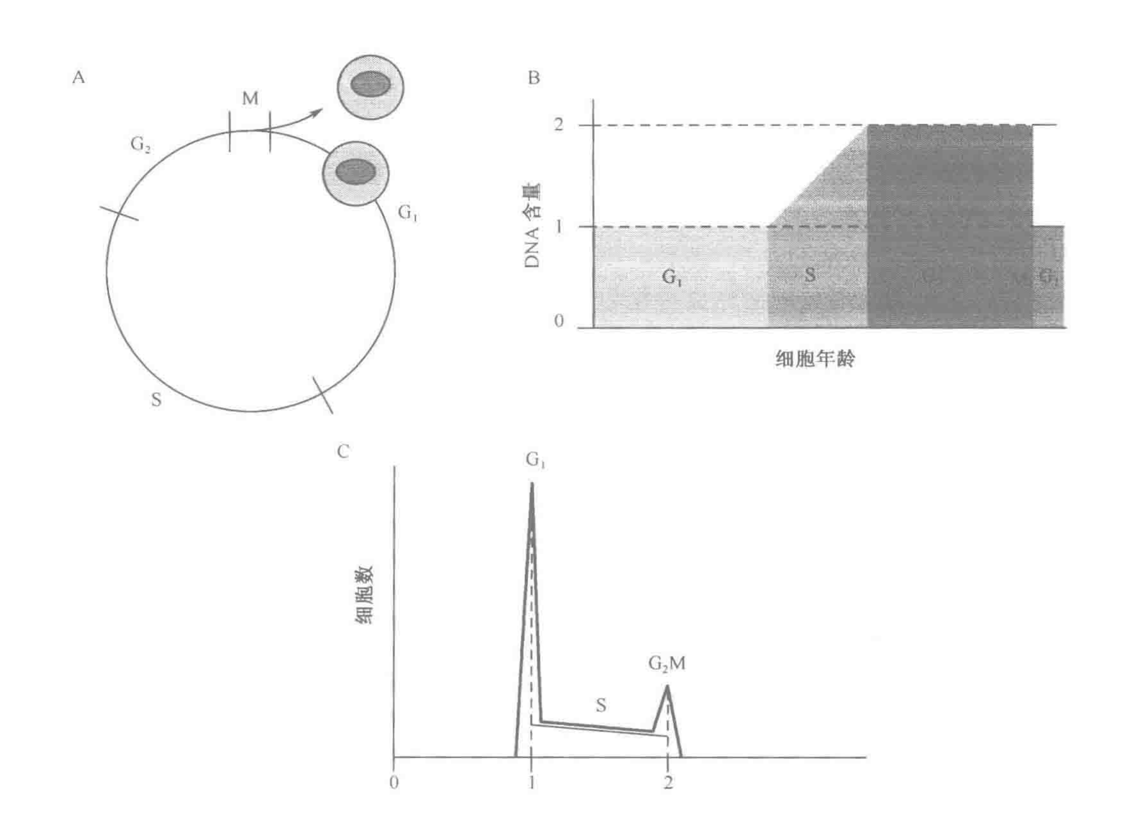


图 11.1.1 DNA 含量和细胞周期的关系

(A) 细胞周期各阶段。(B) 基于 DNA 含量测定估计细胞在细胞周期中的位置。细胞内 DNA 含量在 S 期加倍，因此处于 S 期的细胞年龄可以基于复制 DNA 的量（DNA 含量的增加）来估计。另一方面，考虑到 DNA 含量，G_1 和 G_2/M 期细胞是均衡的，它们的 DNA 倍数性指数（DI）为 1.0（G_1 期）和 2.0（G_2/M 期）。(C) 如果 DNA 含量可以被绝对精确地测量，那么基于 DNA 特异的荧光，G_1 和 G_2/M 期细胞将具有一致的荧光值，并且在频率柱状图上表示为单通道宽度线（虚线）。考虑到 DNA 含量测量的不精确性，实际的数据是 G_1 和 G_2/M期峰的形式。这些峰值代表的和处于 S 期的细胞百分数可以用多种数学方法进行柱状图解析来估计

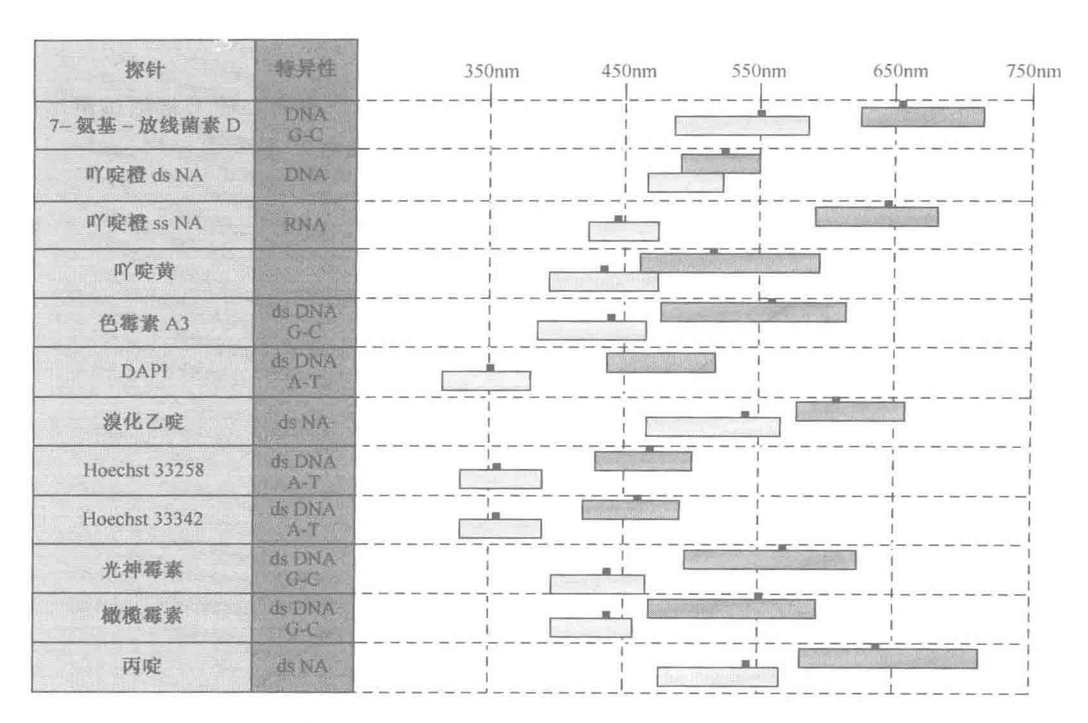


图 11.1.2 最常用的荧光染料的荧光激发（阴影框）和发射（实心框）波长

缩写：ds，双链；ss，单链；NA，核酸

基本方案 1 用碘化丙啶染色的固定化细胞的细胞周期分析

材料（带√项见附录 1）

将用于染色的细胞

√磷酸盐缓冲盐（PBS）

固定液：70%乙醇

√碘化丙啶染液 I

低速离心机

12mm×75mm 离心管，最好是聚丙烯或硅烷化的

流式细胞仪，带有 488nm 氩离子激光器荧光激发光源和长波（>620nm）发射滤片

细胞内 DNA 含量频率柱状图的解析软件（如 Phoenix Flow Systems 的 Multicycle）

1a. 对于悬浮生长的细胞或血液学样品：200g，室温离心 6min，用 PBS 淋洗。进行细胞计数（单元 1.1），并用 0.5ml PBS 彻底重悬（分散良好，不聚集）1×10^6～1×10^7 个细胞。进行步骤 2。

1b. 对于附着在组织培养皿上生长的细胞：用胰蛋白酶消化（单元 1.1），收集烧瓶或组织培养皿中的细胞，将消化得到的细胞与漂浮在培养基中的细胞集中在一起（后者含有脱离的有丝分裂的、凋亡的和死亡的细胞）。将细胞悬液 200g，室温离心 6min。除去上清液，用含有血清（使胰蛋白酶失活）的培养基重悬沉淀，然后再次

离心并去除上清液。进行细胞计数（单元1.1），并用0.5ml PBS彻底重悬（分散良好，不聚集）$1\times10^6 \sim 1\times10^7$ 个细胞。进行步骤2。

1c. 对于从组织（如肿瘤）上分离出的细胞：如上述步骤1a，用离心技术将细胞解离时所用的酶淋洗干净，并用0.5ml PBS彻底重悬（分散良好，不聚集）$1\times10^6 \sim 1\times10^7$ 个细胞。进行步骤2。

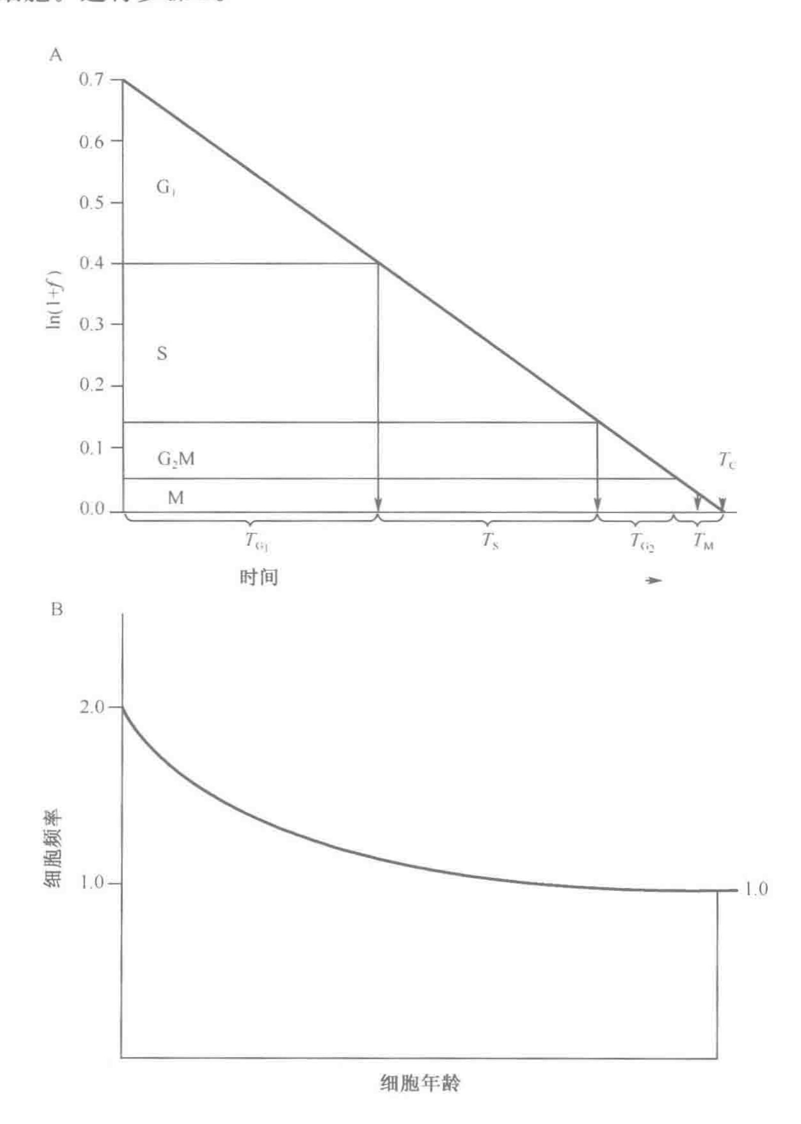


图 11.1.3　估计特定细胞周期各时期时相的图解方法

(A) 该方法基于所有细胞都处于指数增长期的假设，即子代细胞数是母本细胞数的两倍。(B) 处于细胞周期不同时期的细胞比例是通过DNA含量频率柱状图和 T_C 值（细胞世代或细胞周期时间，是作为细胞倍增时间依次从培养细胞生长曲线计算得到）获得的。当所有细胞都处于增殖细胞池中，即生长分数为1.0时，T_C 等于细胞倍增时间。处于细胞周期特定时期的细胞比例（f）以对数形式 ln（1+f）作图。T_C 则与ln2（0.693）相连接。如图所示，连接ln2和 T_C 的线与代表细胞处于周期特定时期频率的水平线的交点，投射到时间坐标上，代表这些时期的持续时间

2. 在每个 12mm×75mm 离心管中加入 4.5ml 70%乙醇固定液准备固定。将管子置于冰上。
3. 用一根巴斯德吸管，将步骤 1a、1b 或 1c 中制备的 0.5ml 等份细胞悬液转移到含有冷的 70%乙醇固定液的管中，冰上固定至少 2h（可以在 0～4℃保存至少数月）。
4. 将乙醇细胞悬液 200*g* 离心 5min，彻底去除乙醇。将细胞沉淀悬于 5ml PBS 中，然后再次 200*g* 离心 5min，弃上清液。
5. 用 1ml 碘化丙啶染液 I 重悬细胞沉淀。37℃孵育 15min 或者室温 30min。
6. 将流式细胞仪设置并调整为蓝光激发，并在红光波长处检测 PI 发射。
7. 用流式细胞术测量细胞荧光。用脉冲宽度/脉冲面积信号来区分 G_2/M 期细胞和二倍体细胞，并将后者分离出。用细胞内 DNA 含量柱状图的解析软件（如 Phoenix Flow Systems 的 Multicycle）分析数据。图 11.1.3 是估计细胞周期各时期时间的方法图解。

备择方案 1　用 DAPI 染色的固定细胞的细胞周期分析

补充材料（同见基本方案 1；带√项见附录 1）

√DAPI 染液 I

流式细胞仪，带有紫外照明光源（例如，汞弧灯或者调节到 340～380nm 紫外光的激光器），短波通透（390nm，如 UG -1）和长波通透（470±20nm）滤片

1. 收集细胞，在 70%乙醇中固定，洗涤（见基本方案 1，步骤 1～4）。用 1ml DAPI 染液 I 重悬细胞沉淀。室温避光孵育 30min。
2. 将流式细胞仪设置并调整为 340～380nm 紫外激发，并在蓝光波长处检测 DAPI 的发射光。用流式细胞术测量细胞荧光，并分析数据（见基本方案 1，步骤 7）。

基本方案 2　用 PI 染色的非固定、去垢剂渗透细胞的细胞周期分析

因为没有固定的步骤，所以该过程比基本方案 1 更简单、更快速。另外，因为离心步骤少，所以细胞损失得更少。

材料（带√项见附录 1）

将被染色的细胞：1×10^6～5×10^6 个/ml，悬于 PBS（见配方）或培养基

√碘化丙啶染液 II

流式细胞仪，带有 488nm 氩离子激光器荧光激发光源和长波（>620nm）发射滤片

细胞内 DNA 含量频率柱状图的解析软件（如 Phoenix Flow Systems 的 Multicycle）

1. 用 2ml 碘化丙啶染液 II 与 0.2ml 细胞悬液混合。室温孵育 20min。
2. 将流式细胞仪设置并调整为蓝光激发，并在红光波长处检测 PI 发射光。用流式细胞

术测量细胞荧光并分析数据（见基本方案 1，步骤 7）。

备择方案 2　用 DAPI 染色的非固定、去垢剂渗透细胞的细胞周期分析

补充材料（同见基本方案 2；带√项见附录 1）

√DAPI 染液 II

流式细胞仪，带有紫外照明光源（例如，汞弧灯或者调节到 340～380nm 紫外光的激光器），短波通透（390nm，如 UG -1）和长波通透（470±20）nm 滤镜

1. 用 2ml DAPI 染液 II 与 0.2ml 细胞悬液混合，室温孵育 10min。
2. 将流式细胞仪设置并调整为 340～380nm 紫外激发，并在蓝光波长处检测 DAPI 的发射光。用流式细胞术测量细胞荧光，并分析数据（见基本方案 1，步骤 7）。

基本方案 3　活细胞用 Hoechst 33342 进行染色

DNA 的活体染色为分离处于不同细胞周期时期的肝细胞提供了可能性。但是，活体细胞染色的 DNA 含量测量的精确性，以及以此区分不同细胞周期时相细胞的能力都要比乙醇固定的或去垢剂渗透的细胞染色方法低得多。

材料（带√项见附录 1）

1mg/ml Hoechst 33342 水溶液（在 4℃避光或铝箔包裹的瓶中保存可达数周）

将被染色的细胞：1×10^{6} 个/ml，悬于 PBS（见配方）或培养基

流式细胞仪，带有紫外照明光源（例如，汞弧灯或者调节到 340～380nm 紫外光的激光器）

1. 细胞悬于 PBS 或培养基中（1×10^{6} 个/ml），加入充足的 1mg/ml Hoechst 33342 使荧光染料终浓度达 2.0μg/ml。4℃孵育 20min。
2. 将流式细胞仪设置并调整为 340～380nm 紫外激发，并在蓝光波长处检测 Hoechst 33342 荧光。用流式细胞术测量细胞荧光，并分析数据（见基本方案 1，步骤 7）。如果细胞荧光强度或细胞所处细胞周期时相分辨率不够的话，延长染色时间（长至 90min）和（或）增加基质中 Hoechst 33342 浓度（可达 5μg/ml）。

基本方案 4　DNA 含量和 Cyclins D、E、A 或 B1 的二元分析

细胞周期分析方法中有特殊的一类，组合了 DNA 含量和增殖相关蛋白质表达的测量。该方案尤其适用于细胞周期蛋白（cyclin），对它们的分析为细胞周期运转机制的真实组分提供了一些认识。因为一些细胞周期蛋白瞬时（在非常特异的细胞周期时间间隔）表达，所以它们在细胞中的存在可以被认为是周期中该特定部分的标记。

材料（带√项见附录1）

待分析的细胞

√磷酸盐缓冲盐（PBS）

固定液：80%（v/v）乙醇或100%（%）甲醇，−20℃

√0.25%（v/v）TritonX-100，溶于PBS，pH7.4（保存于4℃；见PBS配方）

√淋洗缓冲液：1%（w/v）牛血清白蛋白（BSA），溶于PBS，pH7.4（保存于4℃；见PBS配方）

抗cyclin的IgG1抗体：如小鼠单克隆抗体：抗cyclinB1（克隆GNS-1）、抗cyclinA（克隆BF-683）、cyclinD1（克隆G124-326）、cyclinD3（克隆G107-565）和cyclinE（克隆HE12），都由PharMingen提供；cyclinD1的抗体在Immunotech/Coulter也可以购得

小鼠IgG1（同种型对照）

FITC偶联的羊抗小鼠IgG

√碘化丙啶染液III

15ml锥形管，聚丙烯或硅烷化的

低速离心机

流式细胞仪，配有488nm氩激光器荧光激发光源，FITC发射光用（530±20）nm带通滤镜和PI发射光用62nm长波长通过滤镜

1. 收集细胞，并用PBS重悬（见基本方案1，步骤1a、b或c）。
2. 将10ml 80%乙醇或无水甲醇固定液加入适当数量的15ml管子中准备固定（每个将用抗cyclin抗体测试的细胞液滴需一根管，另需同等数量的管子用于同种型对照）。将管子置于冰上（0～4℃）。
3. 用巴斯德吸管将1ml每种细胞悬液转移到含有冷固定液的合适管中，冰上孵育4h到数天。每个样品/对照都在同一管中进行下列步骤，防止细胞损失。
4. 固定的细胞在室温下300*g*离心5min。除去乙醇，用5ml PBS重悬细胞，如前离心。
5. 除上清，用1ml 0.25%TritonX-100 PBS溶液重悬细胞沉淀（$\leqslant 1\times10^6$个）。冰置5min，然后加入5ml PBS，室温300*g*离心5min。除上清。
6. 每种感兴趣的抗cyclin抗体（一抗）用淋洗缓冲液溶解至浓度5μg/ml。每个待分析的样品使用100μl 5μg/ml抗cyclin抗体溶液。另外，为对照细胞准备的每个管中制备100μl 5μg/ml小鼠IgG1（同种型对照）。
7. 将细胞沉淀重悬于100μl含有正确的一抗或同种型对照的淋洗缓冲液中。伴随着轻轻的搅动在室温孵育60min，或者4℃过夜。
8. 每管中加入5ml淋洗缓冲液，室温300*g*离心5min。去除上清。
9. 用淋洗缓冲液按1∶30稀释二抗（FITC偶联的羊抗小鼠IgG）。将每种细胞沉淀重悬于100μl稀释的FITC偶联二抗中，室温下避光轻搅孵育30min。
10. 每管中加入5ml淋洗缓冲液，室温300*g*离心5min。去除上清液，将每个细胞沉淀重悬于PI染液III中。测量前室温下避光孵育20min。

11. 将流式细胞仪设置并调整到激发光为蓝光（488nm 激光线）。测量 cyclin 相关的 FITC 的绿色荧光［用（530±20nm）带通滤镜］以及 DNA 相关的 PI 的红色荧光（用 620nm 长波通透滤镜）。

参考文献：Bagwell，1993；Morgan，1995；Rabinovitch，1994

撰稿人：Zbigniew Darzynkiewicz，Gloria Juan and Elzbieta Bedner

单元 11.2　在细胞周期的特定时期细胞同步化的方法

对于研究特定调节细胞周期的事件，或者为了提取瞬时因子（其表达依赖于细胞周期时相）而制备细胞而言，细胞同步化都是非常有用的。

基本方案 1　采用有丝分裂震脱富集有丝分裂细胞

该方法基于一个发现，即当细胞进入有丝分裂中期时，它们会变圆并且与培养器皿的接触点减少。

材料（带√项见附录 1）

人直肠癌细胞系（HT-29 细胞），生长于 162cm² 组织培养瓶中

√RPMI-15：添加 15%（v/v）热灭活胎牛血清（FBS，见配方）的 RPMI 1640，预热到 37℃

√RPMI 1640 培养基，预热到 37℃

√0.5×胰蛋白酶溶液

1. 将 HT-29 细胞的亚汇合培养物用胰蛋白酶消化（单元 1.1），并用预热的 RPMI-15 以 1/2 或 1/3 最大密度重新植入板中。37℃培养至 70%～80%汇合率。
2. 去除培养基，用预热的 RPMI 1640 洗涤细胞 1 次。加入 3ml 0.5×胰蛋白酶溶液，37℃孵育细胞 5min。
3. 在工作台上轻拍培养瓶使所有松弛的附着的圆形细胞震脱下来，加入 20ml 预热的 RPMI 1640。将细胞悬液转移到 15ml 离心管中，室温 500*g* 离心 5min。弃上清，用预热的 RPMI1640 重复洗涤，然后用 20ml 预热的 RPMI-15 重悬沉淀。细胞计数（单元 1.1），用预热 RPMI-15 调整细胞浓度至 2.5×10^5 个/ml。
4. 将 20～40ml 细胞悬液转移到 162cm² 培养瓶中，37℃孵育 6h。观察培养物看细胞是否重新贴壁。
5. 摇晃培养瓶，使培养基没过瓶表面打漩，吸去培养基。重复洗涤 2 次（每次都用 15ml 预热的 RPMI-15），以去除所有未贴附细胞。加入 20ml 新鲜的预热 RPMI-15，37℃培育 10h。
6. 观察培养物以获得细胞变圆的证据。轻轻摇晃或在工作台上轻拍瓶子，使培养基围

绕瓶子打漩。取出培养基（其中含有有丝分裂细胞），将若干个瓶子的培养基集中起来，室温 500g 离心 5min 沉淀有丝分裂细胞。

7. 用 RPMI-15 重悬细胞，细胞计数（单元 1.1），用 RPMI-15 调整细胞密度至 5×10^5 个/ml。用流式细胞术、Giemsa 染色（用于检测有丝分裂染色体浓缩）或反相显微镜（用于检测变圆的细胞）分析细胞。

进行 Giemsa 染色时，将空气干燥的玻片浸没于 0.1～0.2mg/L Giemsa（Sigma，LifeTechnologies）染液中 10min。浸入 1×PBS 中轻柔地漂净染料，空气干燥玻片。

备择方案 1　预富集指数生长培养物用于分离有丝分裂细胞

与 S 期同步化试剂，如过量的胸苷（见基本方案 4），短暂共孵育可以增加 M 期细胞的比例。通过彻底洗涤并在约 10h 后（当在培养物中观察到显著数量的变圆的细胞时）收集细胞以解除这种阻滞。

备择方案 2　通过诺考达唑阻滞富集有丝分裂细胞

诺考达唑（nocodazole）以化学方法干扰细胞微管的组织，可以将悬浮和贴壁细胞都阻滞于前期到假中期（pseudo-metaphase）状态。

材料（带√项见附录 1）

CA46 细胞，生长于 75cm² 组织培养瓶中

√0.4mg/ml 诺考达唑（稀释自 4mg/ml 诺考达唑）

√RPMI-15：添加 15%热灭活胎牛血清（FBS，见配方）的 RPMI 1640，预热到 37℃

1. 培养 CA46 细胞至亚汇合（0.5×10^6～1.0×10^6 个/ml）。细胞计数（单元 1.1），用预热 RPMI-15 调整细胞浓度至 5×10^5 个/ml。
2. 向培养物中加入 0.4mg/ml 诺考达唑至终浓度为 400ng/ml。37℃培养 12～16h。
3. 细胞于室温 500g 离心 5min，弃上清，沉淀重悬于 20ml 新鲜、预热的 RPMI-15 中。再次离心，加入 20ml 预热的 RPMI-15。
4. 转移细胞悬液至新的 75cm² 组织培养瓶中，37℃孵育 4h。在接下去的 4h 时间内监测培养物细胞数量的增加（它显示的是进入 G_1 期的情况）。

基本方案 2　通过血清饥饿富集 G_0/G_1 细胞

使用该技术之前，确定细胞可达到的汇合度/最大细胞密度（个/ml 或个/cm²）是非常重要的。

材料（带√项见附录 1）

NIH-3T3 细胞，生长于 100mm 组织培养板中

1×胰蛋白酶（Life Technologies）
√DMEM，预热至37℃
√DMEM-0.5：添加0.5%（v/v）热灭活FBS（见配方）的DMEM，预热至37℃
√DMEM-10：添加10%（v/v）热灭活FBS的DMEM，预热至37℃

1. 将在100mm组织培养板指数生长的NIH-3T3细胞用1×胰蛋白酶进行消化（单元1.1）。将剥离的细胞转移到15ml锥形离心管中，室温500*g*离心5min。弃上清，沉淀重悬于10ml预热的DMEM中，重复离心。重复洗涤。
2. 用15ml DMEM-0.5以30%～40%汇合密度植入细胞，37℃培养24～48h。去除DMEM-0.5，加入15ml DMEM-10。37℃培养。

   加入含有15%FBS的培养基刺激细胞重新进入细胞周期。NIH-3T3细胞在刺激后约12h进入S期；该时间随细胞类型而变化。

备择方案3 通过氨基酸饥饿富集G_0/G_1细胞

材料（带√项见附录1）

CA46细胞，生长于162cm^{2}组织培养瓶中
无异亮氨酸的最小限度必需培养基（如Select-Amine Minimal Medium，Life Technologies），预热到37℃
透析的FBS（Life Technologies）
√RPMI-15：添加15%（v/v）热灭活FBS（见配方）的RPMI 1640

1. 将指数生长的CA46细胞于室温下500*g*离心5min。弃上清，沉淀重悬于50ml预热的无异亮氨酸的最小限度必需培养基中，再次离心。重复洗涤。
2. 用无异亮氨酸的最小限度必需培养基/10%透析的FBS以35%～40%汇合密度重悬细胞，转移到适当大小的组织培养瓶中，37℃培养36～42h（对于CA46细胞而言为1.5～2个细胞周期；对于其他细胞类型需调节）。
3. 将细胞转移到50ml离心管中，室温下500*g*离心5min，其间避免粗暴的或不必要的操作。弃上清，沉淀以0.5×10^6个/ml的最终细胞密度重悬于RPMI-15。

基本方案3 用洛伐他汀富集G_1期细胞

洛伐他汀（Lovastatin）被证明可以将许多类型细胞，包括贴附细胞和悬浮细胞，阻断在极早G_1期，而非G_0期。

材料（带√项见附录1）

MCF-7细胞，生长于100mm组织培养板中
1×胰蛋白酶（Life Technologies）
√DMEM-10：添加10%（v/v）热灭活FBS（见配方）的DMEM，预热至37℃

√10mmol/L 活化的洛伐他汀
√含有 5mmol/L 甲羟戊酸（mevalonate，Sigma）DMEM-10

1. 将指数生长的 MCF-7 细胞用 1×胰蛋白酶进行消化（单元 1.1）。用 15ml DMEM-10 以最大细胞密度的 30%～35%重新铺板。
2. 加入 10mmol/L 活化的洛伐他汀至终浓度为 40μmol/L，37℃培养 24～36h（或者对于细胞类型适合的时间；应该持续至少一个倍增时间）。
3. 用 3～5ml 1×胰蛋白酶消化细胞。细胞中加入 5ml 预热 DMEM-10，室温 500*g* 离心 5min。弃上清，沉淀重悬于 10ml 预热的 DMEM-10 中，重复离心。重复洗涤。
4. 用 15ml 含有 5mmol/L 甲羟戊酸 DMEM-10 重悬细胞，使其达 35%～40%汇合密度。
5. 用流式细胞术、cyclinE 或 cyclinA 依赖的激酶的活化或者将标记的核苷前体掺入 DNA（见支持方案 2）的方法，监测细胞进入 G_1 期和 S 期。

备择方案 4　用含羞草碱阻滞富集 G_1 期细胞

根据恢复时间和起始 ^{3}H 胸苷掺入时间的关系，含羞草碱（mimosine）可以将细胞阻滞在 G_1 后期，也可以阻滞在 G_1/S 边界。

材料（带√项见附录 1）

CA46 细胞，生长于 75cm² 组织培养瓶中
√RPMI-15/含羞草碱：添加 15%（v/v）热灭活 FBS（见配方）和 400μmol/L 含羞草碱（稀释自 100mmol/L 含羞草碱；见配方）的 RPMI 1640，预热至 37℃
√RPMI-15：添加 15%（v/v）热灭活 FBS（见配方）的 RPMI 1640，预热至 37℃

1. 将 5×10^6～25×10^6 个指数生长的 CA46 细胞或预先经异亮氨酸撤除法（见备择方案 3）同步化的 CA46 细胞，于室温下 500*g* 离心 5min。弃上清，沉淀重悬于预热的 RPMI-15/含羞草碱中，使细胞终浓度达 0.4×10^6 个/ml。37℃培养 6～24h（指数生长细胞）或 14h（异亮氨酸撤除细胞）。
2. 室温下 500*g* 离心 5min。弃上清，沉淀重悬于 10ml 预热的 RPMI-15，重复离心。重复洗涤，用预热的 RPMI-15 重悬细胞，使细胞密度相当于 35%～40%汇合密度（0.4×10^6 个/ml）。
3. 采用将标记的核苷前体掺入 DNA（见支持方案 2）或流式细胞术监测细胞进入 S 期。

基本方案 4　通过双重胸苷阻滞使细胞在 S 期起始处达到同步化

使用该技术之前，确定对数生长培养物的倍增时间是非常重要的。下述程序基于倍增时间 24h 使 HeLa 细胞同步化。该方案对于贴附细胞和悬浮细胞都适用。唯一的要求是细胞具有固定的、不多于 24～30h 的倍增时间。

材料（带√项见附录 1）

HeLa 细胞，生长于 162cm^2 组织培养瓶中

√DMEM-10/胸苷：添加 10%（v/v）热灭活 FBS（见配方）和 2mmol/L 胸苷（稀释自 100mmol/L 胸苷；见配方）的 DMEM，预热至 37℃

√DMEM，预热至 37℃

√DMEM-10：添加 10%（v/v）热灭活 FBS（见配方）的 DMEM，预热至 37℃

1×胰蛋白酶（LifeTechnologies）

1×PBS，pH7.4

1. 将指数生长的 HeLa 细胞用 15ml DMEM-10/胸苷，以 30%～35%汇合率植入培养瓶，37℃培养 12h。

   该时期相当于通过 G_2/M 和 G_1 期的时间。在该过程中，G_2/M 期细胞将进入 G_1 期，然后与原来的 G_1 期细胞一起达到相当于 G_1/S 期边界细胞的生化状态。当加入胸苷时，所有处于 S 期的细胞都将被阻滞。
2. 用吸管吸去含有胸苷的培养基，彻底漂洗培养皿所有表面 2 次，每次使用 10ml 预热的 DMEM-10。
3. 用 1×胰蛋白酶消化细胞，重悬于 10ml DMEM-10，对悬液中的细胞进行计数（单元 1.1）。细胞用 15ml 预热的 DMEM-10 以 30%～35%汇合密度重新铺板。

   该过程中，细胞将从胸苷阻滞（约 1～2h）中恢复过来，进入细胞周期，分裂并进入下一个细胞周期的 G_1 期。如果希望细胞可以再经历两个循环，它们应该以约 25%汇合率接种。

   细胞穿过第一个胸苷阻滞可以通过确定细胞数来监测。除去胸苷都大约 5～6h，被阻滞在 S 期末的细胞（前沿细胞）将进入下一个细胞周期的 G_1 期，即可检测到细胞数量的增加。为了让前沿细胞（它们在第一次阻滞中被阻断于 G_1/S）有充分的时间穿过 S 期，应该在约 8～10h 后再用不添加胸苷的培养基培养。
4. 用吸管吸去培养基，代之以 15ml 预热的 DMEM-10/胸苷，37℃培养 12～14h。

   处于 G_2/M 和 G_1 期的细胞将前进并被阻滞于 G_1/S 期边界。
5. 用吸管吸去含有胸苷的培养基，彻底漂洗培养皿所有表面两次，每次使用 15ml DMEM-10。
6. 用流式细胞术监测细胞进入 S 期，用 cyclin B-cdc2 依赖的激酶的集合和活化（单元 11.3）监测进入 G_2/M，或用细胞变圆、有丝分裂指数（见支持方案 1）或细胞数的增加来监测通过 M 期。

备择方案 5　进行连续的 G_1/S 阻滞

常用的其他技术包括第一次阻滞用胸苷而第二次阻滞用蚜栖菌素（aphidicolin），或者两次蚜栖菌素阻滞。本质上使用蚜栖菌素的基本原理和基本方案 4 中描述的两次胸苷阻滞的是一样的。使用胸苷和蚜栖菌素的过程使细胞同步化于 G_1/S 期边界，被证明

在不同细胞周期相关过程（包括组蛋白基因表达调节、cyclin B 的调节和 DNA 损伤对 cyclin A-和 cyclin B 依赖的激酶的影响）的调节研究中非常有用。饥饿法加随后的蚜栖菌素处理对于获得高度同步化的 G_1/S 细胞群体尤其有用。

蚜栖菌素是真核 DNA 聚合酶特异的抑制剂。用蚜栖菌素处理细胞可以抑制 S 期细胞通过 S 期剩余的阶段，而 G_1 和 G_2/M 细胞则继续前进至 G_1/S 边界。由于这个原因，单一的蚜栖菌素阻滞往往不足以得到高度同步化的培养物。通过将蚜栖菌素（见配方）以终浓度为 0.1μg/ml 加入指数生长的细胞中，蚜栖菌素可以替代基本方案 4 中两次使用的胸苷。

人们已经更好地描述了蚜栖菌素阻止细胞进入 S 期时刻的特征，该时刻比胸苷阻滞更接近 S 期的起点。从蚜栖菌素中释放出来后 15min 之内核苷前体开始掺入 DNA，因此对于一些考察 S 期进程的研究而言，蚜栖菌素更加适合。重要的是，蚜栖菌素阻滞复制性 DNA 聚合酶，而非其他复制有关的事件，例如，复制起点的松弛以及复制复合物的装配。由于该原因，关于蚜栖菌素将细胞阻滞于细胞周期的哪个确切时期还存在争议。清楚的是，蚜栖菌素阻滞细胞所处的细胞周期时期在 S 期刚开始时、脱氧核苷掺入 DNA 长链之前。

蚜栖菌素可被用于悬浮细胞或贴壁细胞。蚜栖菌素在快速、可靠并可获得高度同步化的可立即进入 S 期的细胞群体的同时，它的使用也比胸苷来得昂贵。另外，用蚜栖菌素持久处理细胞会引起 DNA 片段化。

支持方案 1　测定有丝分裂指数

材料（带√项见附录 1）

Burkitt 淋巴瘤细胞系（CA46 细胞），生长于 RPMI-15 中，同步化和未同步化的

√RPMI-15：添加 15%（v/v）热灭活 FBS（见配方）的 RPMI

√1×PBS，pH7.4，冰冷

√0.5×PBS，pH7.4，或 75mmol/L KCl，冰冷

3∶1（v/v）乙醇/冰乙酸，冰冷

Giemsa 染料（Sigma，Life Technologies；可选）

1. 在不同的时间点，根据同步化方案中描述的方法或者换成新鲜 RPMI-15，刺激使 >1×10^3 CA46 细胞进入细胞周期。
2. 在适当的时间点，将细胞转移到 15ml 离心管中，室温 500*g* 离心 5min。弃上清，沉淀细胞重悬于 2 体积冰冷的 1×PBS 中，重复离心。弃上清，细胞重悬于 0.5ml 冰冷的 0.5×PBS 10min，或冰冷的 75mmol/L KCl 中不短于 20min，在冰上使细胞膨胀但不破裂，这使得有丝分裂的轮廓更容易被区分。

   时间点的数量和频率依赖于实验。对于 G_1-或 S-同步化细胞而言，有丝分裂指数可以每 4h 监测；对于 S 晚期-和 M-同步化细胞而言，应该每 30min 监测。应该在相同的时间点分析未同步化的细胞来估计同步化方案的成功性。
3. 室温 500*g* 离心细胞 5min。弃上清，沉淀重悬于 0.5ml 3∶1 乙醇/冰乙酸中（细胞终

浓度为 $1\times10^3\sim5\times10^3$ 个/ml)。重悬时用一个手指轻弹管底，避免细胞结块。

4. 将大约 100μl 细胞滴加到玻片上，每个时间点制备 2 或 3 块玻片（调整细胞数量，使不重叠；如果必要，微微倾斜玻片促进扩展)。让玻片于空气中干燥 0.5～2h。
5. 细胞用 0.1～0.2mg/L Giemsa 染液染色 10min。浸入 1×PBS，轻柔地将玻片上的 Giemsa 染液漂洗干净，空气中干燥玻片。
6. 在显微镜下观察玻片，寻找具有有丝分裂特征、浓缩的核物质以及核膜消失的细胞。给每个时间点的 200～500 个细胞打分。将结果整理成有丝分裂细胞占观察细胞总数的百分数。

支持方案 2　通过 TCA 沉淀监测 ^3H 胸苷掺入 DNA

材料（带√项见附录 1)

CA46 细胞，从同步化中释放出来的

√RPMI-15：添加 15%（v/v）热灭活 FBS（见配方）的 RPMI，预热到 37℃

^3H 胸苷（20～60Ci/mmol)

√1×PBS 和 0.5×PBS，pH7.4，或 75mmol/L KCl，冰冷

5%和 20%（v/v）TCA，冰冷

95%乙醇

干冰/甲醇浴

桶装冰水

玻璃纤维滤器

真空集合管

真空干燥炉，80℃

1. 通过替换氨基酸或生长因子（基本方案 2，备择方案 4）或去除抑制剂（基本方案 3，基本方案 4，备择方案 4）释放细胞进入细胞周期，随后将若干等份的 1×10^5 CA46 细胞转移到 15ml 塑料离心管中。
2. 室温 500g 离心细胞 5min。弃上清，沉淀重悬于等体积的添加 50μCi/ml ^3H 胸苷的预热 RPMI-15。37℃孵育 30min。
3. 室温 500g 离心细胞 5min。弃上清，沉淀重悬于 5ml 冰冷的 1×PBS。重复 PBS 洗涤，并重悬于 0.5ml 0.5×PBS。
4. 将细胞置于干冰/甲醇浴中的试管架上，维持 1～3min。让细胞在 37℃孵育 3～5min 使解冻。重复冻融两次以裂解细胞。
5. 将含有细胞裂解液的管子置于装有冰水的桶中。加等体积冰冷 20%TCA 到裂解液中，冰上放置 30min。
6. 用 5%TCA 湿润玻璃纤维滤器，然后放入真空集合管，根据产品说明书密封需要的地方。将沉淀转移到真空下的玻璃纤维滤器上。用 2 体积冰冷的 5%TCA 洗涤每个试管两次，这些物质也转移到正确的滤器上。
7. 用 5ml 冰冷的 5%TCA 真空下洗涤滤器 3 次，并用 5ml 冰冷的 95%乙醇洗 1 次。将

滤器转移到闪烁管中，松弛地盖上盖子。将小管放入 80℃真空炉约 45min。包括作为背景阴性对照的空白滤器。

8. 每个小管中加入 5～10ml 闪烁液。放入闪烁计数器，每个在^{3}H 通道计数 5min。从多个等分样品得到平均 cpm，并对释放时间作图。

参考文献：Hartwell and Kastan，1994；Pines，1995

撰稿人：Joany Jackman and Patrick M. O'Connor

单元 11.3　分析细胞周期中 CDK 活性和 DNA 复制

中期的特定时期可以根据下述的哪些 cyclin-CDK 复合物的存在和活化来鉴定：

cyclinE-CDK2 活性出现于晚 G_1 期，消失于早 S 期。

cyclinA-CDK2 活性出现于早 S 期，消失于早 M 期。某些细胞类型中，cyclinA-CDK1 活性出现于 G_2 期，也消失于早 M 期。

cyclinB-CDK1 活性出现于 G_2 期，消失于中 M 期。

基本方案 1　测量 CDK 活性

着手免疫沉淀和蛋白激酶分析之前选择抗体时，有两点必须考虑：

1. 因为许多 CDK 可以结合一种以上的 cyclin，因此相对于 cyclin 所识别的 CDK 抗体，使用直接针对 cyclin 的抗体将对细胞周期时相给出一个更精确的指示。不幸的是，大多数抗 cyclin 的抗体具有相当的种属特异性，可能是因为 cyclin 的一级结构的保守性与 CDK 相比显得差得多。
2. cyclin 和 CDK 的一些结构域在活性复合物中是被遮蔽的。针对 CDK 的保守部分 PSTAIRE 模体制备的抗体只能识别未结合的、没有活性的激酶，故其仅用于免疫印迹，而激酶分析时不能应用。同样的，针对 cyclin 的 C 端制备的抗体也不能应用，因为它们常常只识别单体蛋白质。

该方案将很好地指示细胞周期的时期，因为它对于 cyclinA、cyclinB 和 cyclinE 以及它们的“搭档”激酶 CDK1 和 CDK2 都非常有效。cyclinD 和 CDK4 或 CDK6 的复合物不能用该法分析。

材料（带√项见附录 1）

生长于 6cm 组织培养皿的细胞

√1×PBS，冰冷

√裂解缓冲液，冰冷

蛋白 A-或蛋白 G-Sepharose 偶联的（Amersham Pharmacia Biotech）或甲醛处理的金黄色葡萄球菌（Pansorbin，Calbiochem）

抗 cyclin 抗体、抗 CDK 抗体或 Cks-Sepharose 珠偶联物（Upstate Biotechnology）
√激酶缓冲液，冰冷
√组蛋白 H1 溶液或一致的 cdc2 肽段（New England Biolabs）
√1mmol/L ATP（100mmol/L ATP 用蒸馏水稀释）
2000Ci/mmol [γ-^{33}P] ATP 或 3000Ci/mmol [γ-^{32}P] ATP
√100mmol/L EDTA
√2×SDS 上样缓冲液
√PKA 抑制性肽段：1mmol/L 肽（Sigma）溶于 10mmol/L 磷酸钠，pH7.2（见缓冲液配方；－20℃保存肽溶液可达 1 年）
50mmol/L roscovitine 或 100mmol/L olomoucine（都来自 Calbiochem）DMSO 溶液（两种溶液都分装保存在－20℃可达 1 年，只溶解一次；olomoucine 避光保存）
阴性对照：免疫沉淀下来的免疫前血清或抗 IgG 抗体
阳性对照：纯化的 cyclinB-CDK1
75mmol/L 磷酸（7.5ml 1mol/L 磷酸溶于 92.5ml 蒸馏水；室温放置可达 2 年）
96%乙醇
15%～20%SDS 聚丙烯酰胺凝胶（单元 7.1）
√考马斯亮蓝 G-250 染液
脱色液：10%（v/v）乙酸
1ml 注射器和 21G 针头，预冷到 4℃
1.5ml 微型离心管，预冷到 4℃
1ml 吸头，预冷到 4℃
磷酸纤维素单位膜（Pierce）或 1.5cm 见方的磷酸纤维素 P81 滤纸（Whatman）
微型离心机，4℃
翻滚式旋转器或旋转轮
Whatman 3MM 滤纸
磷屏成像仪（可选）

1. 将含有细胞的 6cm 组织培养皿置于冰上的玻璃盘上，最好是在冷室中。用巴斯德吸管吸去培养基，加入 3ml 冰冷 PBS，维持在冰上 1min。倾斜培养皿，用巴斯德吸管除去 PBS。用冰冷 PBS 重复洗涤，通过引流，小心地从培养皿中取出尽量多的 PBS。
2. 加入 1ml 裂解缓冲液，皿置冰上 20min。倾斜培养皿，用橡皮刮铲或细胞刮刀将裂解物刮到一边。
3. 用装有预冷 21G 针头的预冷 1ml 注射器吸出裂解液，转移到一个预冷 1.5ml 微型离心管中。用针头吹吸裂解物 3 次以剪切 DNA。也可以对管子进行超声，注意始终维持裂解物冰冷状态。
4. 裂解液中加入 10μl 蛋白 A-或蛋白 G-Sepharose，或甲醛处理的金黄色葡萄球菌细胞。盖上盖子，10 000 *g*，4℃微型离心 20min 净化裂解液。用预冷的 1ml 吸头取出裂解液（约 900μl），小心不要扰动沉淀。如果需要，裂解液冷冻并保存于－80℃；仅溶

解 1 次，不要再次冰冻。

5. 将裂解液（约 900μl）加入冰上装有适量的抗 cyclin 抗体、抗 CDK 抗体或 Cks-Sepharose 珠的预冷的 1.5ml 微型离心管中，4℃孵育 1h 或过夜，在翻转式旋转器或旋转轮（用于 Cks-Sepharose 珠）上不停地混合。
6. 10 000 *g*，4℃微型离心 5min。裂解液转移到一个新的、装有 30～50μl 50%蛋白 A-或蛋白 G-Sepharose（悬于冰冷裂解缓冲液中）混合物的预冷 1.5ml 微型离心管中。在翻转式旋转器或旋转轮上 4℃混合 30～45min。
7. 4℃最大速度微型离心 5s。用连接在抽吸器上的 1ml 吸头或 21G 针头吸去裂解液。沉淀中加入 700μl 冰冷裂解液，10 000 *g*，4℃微型离心 5min。重复微型离心 3 次，每次都用 700μl 冰冷裂解液。
8. 去除上清液，沉淀中加入 1ml 冰冷激酶缓冲液，10 000 *g*，4℃微型离心 5min。若用于 SDS-PAGE 分析，则将最后一次洗涤液中的 Sepharose 珠子转移到一个螺旋盖式微型离心管中。
9. 准备激酶分析混合物：

   80μl 激酶缓冲液
   4μl 1mmol/L ATP（终浓度 40μmol/L）
   4μl 10μCi/μl [γ-^{33}P] ATP（2000Ci/mmol）或 [γ-^{32}P] ATP（3000Ci/mmol）
   0.5μl 10mg/ml 组蛋白 H1（终浓度 50μg/ml）
   9.5μl 双蒸水

10. 从沉淀中尽可能多地去除最后的洗涤液，但不能使沉淀完全变干。向冰上的免疫沉淀或 Cks-Sepharose 珠子中加入 20μl 激酶分析混合物，30℃孵育 30min。阴性对照免疫沉淀和阳性对照中也加入 20μl 激酶分析混合物。

用闪烁计数法分析

11a. 样品中加入 100μl 100mmol/L EDTA 停止反应。将磷纤维素单位膜装在架子上，用一个吸管将样品吸到磷纤维素单位膜上，小心吸管头不要触及膜面。也可以将样品点到放在玻璃皿中的 1.5cm 见方的磷纤维素 P81 纸上。

   磷纤维素单位膜和 P81 纸带负电荷，因此底物中必须含有一些带正电的残基（组蛋白 H1 或一致性 cdc2 肽段）。

12a. 磷纤维素单位膜在室温下 10 000 *g* 微型离心 30s。加入 500μl 75mmol/L 磷酸并再次快速旋转。将磷纤维素单位膜转移到新的微型离心管中，加 500μl 75mmol/L 磷酸，再次快速旋转。也可以用 5ml 75mmol/L 磷酸漂洗 P81 方片纸 3 次并用 5ml 96%乙醇漂洗 1 次。

13a. 将纤维素单位膜或 P81 滤纸转移到闪烁管中，加入 2～10ml 闪烁液，如果使用^{32}P 则在^{32}P 通道，如果用^{33}P 则在^{35}S 通道计数。

用 SDS-PAGE 分析

11b. 样品中加入 10μl 2×SDS 上样缓冲液以终止反应。在螺旋管帽的离心管（减少放射性同位素蒸发的危险）中煮沸样品 3min。

12b. 样品在 15%～20%SDS-聚丙烯酰胺凝胶（单元 7.1）上运行。

13b. 将凝胶放置在平底容器中，加入 500ml 染液，室温下维持 15min。去除染液并加入 500ml 脱色液 20min。用 250ml 脱色液重复脱色 3 次，每次 15min。

14. 将凝胶放在 Whatman 3MM 滤纸上，用塑料纸包裹，用凝胶干燥仪在 80℃ 干燥凝胶 1h。凝胶用磷屏成像仪或 X 射线胶片曝光。

    磷酸化组蛋白 H1 通常可以用手持式 β 计数器在干胶上检测到。如果使用 ^{32}P，将一块打有孔的铅屏盖在凝胶上，来估计单一泳道的放射性同位素量。如果使用 ^{33}P，使用另一块 X 射线胶片阻挡其他泳道的信号。

15b. 用磷屏成像仪或曝光胶片光密度计测量掺入标记的量。

    标记的组蛋白 H1 将作为一组双带出现在约 30kDa 处。

基本方案 2　用 BrdU 掺入测量 DNA 复制

材料（带√项见附录 1）

1mg/ml 多聚 L-亮氨酸：20mg 多聚 L-亮氨酸（平均分子质量 400 000Da）/20ml 水；用 0.45μm 滤器过滤除菌，−20℃可保存 3 个月

细胞培养基

√细胞悬液：10^5 个/ml PBS（单元 1.1；PBS 见配方）

√10mg/ml BrdU

√1mg/ml 5 氟脱氧尿嘧啶（FrDU；可选）

√PBS

封闭液：3%（w/v）BSA 的 PBS 溶液

√50%甲醇/50%丙酮（固定剂；新鲜制备）或甲醛溶液（交联剂；见配方）和 Tris・Cl/$MgCl_2$/TritonX-100（TSM；见配方）

√*Eco*RI 外切核酸酶和外切核酸酶 III 或 HCl/TritonX-100（见配方）

偶联的抗 BrdU 抗体；或非偶联抗 BrdU 抗体和荧光基团标记的二抗（Amersham）

含有防淬灭剂的载玻片封固溶液（pH 调节到≥8.5）

精细 Watchmaker's 镊子，一个头被弯成约 20°

6～10cm 组织培养皿

一级（0.15mm）盖玻片，洗净并干热灭菌

细胞离心机（可选）

湿盒：如颠倒皮氏皿，并在盖子上放一张湿润的滤纸

1. 将干净的、干热除菌的盖玻片放入 10cm 组织培养皿中的多聚 L-亮氨酸溶液中，37℃孵育 5～15min（用精细 Watchmaker's 镊子操作）。用水洗涤盖玻片，室温下空气干燥。
2. 将盖玻片放入 6～10cm 组织培养皿中，加足够的细胞培养基以盖过皿的表面（3～5ml）。加入细胞悬液（量根据实验定；重新贴附后不能汇合）。将悬浮细胞在细胞离心机上甩到盖玻片上，或者将 10^5 个/ml 的细胞悬液在含有多聚 L-亮氨酸的 PBS 中

作简短培养，37℃，10min（或对于细胞系而言合适的时间）。在染细胞前至少 3～4h 进行细胞接种，使它们得以正确贴附。

3. 向细胞悬液中加入 BrdU 至终浓度 25～100μmol/L。37℃孵育 15min 到数小时（高浓度对应短的时间）。若标记大于 2h，加入 FrdU 至终浓度 0.4μmol/L（可选）。
4. 去除 BrdU，每次用 5ml PBS 洗涤盖玻片 5 次。盖玻片转移到含有 5～10ml PBS 的玻璃皮氏皿中。前进到细胞固定或渗透。

5a. 用甲醇/丙酮来固定/渗透细胞：用 5ml PBS 漂洗盖玻片，甩干 PBS。小心加入足够的固定剂以覆盖盖玻片（3ml），室温下孵育 2min。去除固定剂并用 5～10ml PBS 漂洗盖玻片。前进到步骤 6。

5b. 用甲醛固定细胞，然后用 TSM 渗透细胞：用 5ml PBS 漂洗盖玻片，甩干 PBS。小心加入足够的甲醛溶液以覆盖盖玻片（3ml），室温下孵育 2～5min。用 5ml PBS 小心漂洗细胞 2 次。流干 PBS，加足够的 TSM 浸没盖玻片（3～5ml），室温孵育 5～10min。排干 TSM，用 5～10ml PBS 洗涤 2 次，每次 2min。前进到步骤 6。

6. 在湿盒内湿润的滤纸顶部放一张封口膜（Parafilm），吸取约 25μl 封闭液加到膜上。通过接触擦镜纸边缘吸干盖玻片上过量的 PBS。将盖玻片细胞面朝下放置在封闭液滴上面，孵育 15～30min。前进到酸处理或核酸酶处理使 DNA 变性。

7a. 酸法 DNA 变性：将盖玻片放置于玻璃皮氏皿内，加 5～10ml HCl/TritonX-100，室温孵育 10min。将盖玻片转移到新的皮氏皿中，用 10ml PBS 洗涤 2 次，每次 5min 以中和盐酸。前进到步骤 8。

7b. 用核酸酶使 DNA 变性：*Eco*RI 和外切核酸酶 III 用它们根据产品说明书推荐的缓冲液稀释，在湿盒中，将盖玻片细胞面朝下放置在约 150U/ml *Eco*RI 液滴上，37℃孵育 30min。最后，将盖玻片放置在 300U/ml 外切酶 III 液滴上，37℃孵育 30min。前进到步骤 8。

8. 根据产品说明书用封闭液稀释抗 BrdU 抗体（对于单克隆抗体而言通常是 2～5 μg/ml）。将盖玻片细胞面朝下放置在抗 BrdU 抗体上。盖玻片与抗 BrdU 抗体室温孵育30～60min。
9. 用镊子将盖玻片夹离封口膜，细胞面朝上放置于含 5ml PBS 的皮氏皿中。洗涤盖玻片 4 次，每次用 5ml PBS，持续 5min。如果抗 BrdU 抗体直接偶联荧光基团，前进至步骤 12。
10. 根据产品说明书用封闭液稀释荧光基团标记的二抗（通常是 1∶200～1∶5000）。用镊子将盖玻片从 PBS 中取出，细胞面朝下放置在荧光基团标记的二抗液滴上，室温孵育 30～60min。洗涤盖玻片 4 次，每次用 5ml PBS，持续 5min。
11. 将盖玻片浸入烧杯内水中以去除所有盐分，然后通过将盖玻片边缘置于擦镜纸上来吸干水分。
12. 将每个盖玻片细胞面朝下放在滴有一小滴含防淬灭剂的封固溶液的高质量干净显微镜载玻片上。用擦镜纸去除盖玻片周围所有过量的封固溶液，小心不要移动盖玻片。在边缘周围用少量指甲油封住。4℃或－20℃避光保存载玻片可达 3 个月。
13. 采用合适的滤片，在落射荧光（epifluorescence）显微镜下观察在玻片上的第一或第二抗体上的荧光基团。

参考文献： Dunphy，1997

撰稿人： Jonathon Pines，Mark Jackman，and Karen Simpson

单元 11.4 通过 DNA 片段化和形态学标准评价凋亡和坏死

细胞死亡通过凋亡，或程序性细胞死亡，坏死，或损伤或外伤造成的细胞死亡发生。凋亡细胞共有一些一般特征，如磷脂酰丝氨酸（PS）暴露、细胞收缩、染色质裂解、核浓缩以及浓缩染色质固缩小体的形成。坏死细胞表现为核膨胀、染色质絮凝、核嗜碱性丢失、细胞质结构和细胞器功能崩溃以及细胞膨胀破裂。表 11.4.1 列举了一些测定/区别凋亡和坏死的方法。

表 11.4.1 确定凋亡和坏死的方法

方法	方案	结果	
		凋亡	坏死
形态学/细胞学分析			
台盼蓝染色	基本方案 1	没有染色（早期凋亡） 染成蓝色（晚期凋亡）	蓝色细胞
差异染色	基本方案 2	膜发泡，染色体浓缩和核皱缩，细胞质收缩以及细胞体积变小	核膨胀，染色质絮结，膜发泡并破裂，出现细胞“幽灵”*
Hoechst 染色	基本方案 3	增加的蓝色荧光、片段化或浓缩核	蓝色核弥散染色
流式细胞术	—	减少的前面和旁边分散	增加的前面和旁边分散
膜联蛋白 V（AnnexinV）结合和 PI 染色	—	AnnexinV 结合阳性荧光反应；排斥 PI	阳性荧光；摄入 PI
染色质裂解分析			
TUNEL 分析	基本方案 4 和备择方案 1	检测到链断裂	检测到链断裂
全细胞 DNA 片段化	基本方案 5	DNA 梯带	DNA 拖尾
总基因组 DNA 片段化	备择方案 2	DNA 梯带	DNA 拖尾
DNA 片段化的简单方案	备择方案 3	DNA 梯带	DNA 拖尾
DNA 片段化的酚提取	备择方案 4	DNA 梯带	DNA 拖尾
DNA 片段化的定量分析	基本方案 6	片段化 DNA 百分数增加	片段化 DNA 百分数增加
高分子质量 DNA 脉冲场检测	基本方案 7	高分子量条带	DNA 拖尾
caspase 活化分析			
特异性底物裂解分析	单元 11.5	裂解的荧光底物检测阳性	荧光检测没有变化
caspase 活化的免疫检测	单元 11.5	caspase 前体裂解产物检测阳性	没有检测到裂解产物

* 译者注：意为隐隐约约的细胞轮廓。

形态学分析

基本方案 1　台盼蓝排斥测量细胞死亡

由于该法不能指示细胞死亡的方式，所以它应该仅用于与其他更能提供信息的形态学方法联用。

材料

待估计细胞悬液
2×PBS 药片，pH7.2～7.4（Sigma）或 2×PBS（见配方）
0.2%（w/v）台盼蓝（Sigma）溶于 2×PBS（4℃保存可达 1～2 个月）
血球计数器：改进的 Neubauer 型（KarlHecht；Baxter）或同等物
盖玻片（如 Chance Propper）
光学显微镜

1. 从细胞悬液中取出含有约 5×10^4 个细胞的等分液滴。加入等体积 0.2%台盼蓝，混匀，室温孵育 1～2min 使染料被摄取。
2. 将样品载至血球计数器。在血球计的 5 个主要区域内，计出细胞总数以及未被染色的细胞数。计算每个区域的细胞平均数。
3. 通过每个区域细胞平均数和稀释因子（该情况下为 2）和血球计数器指数（10^4）相乘，计算每毫升培养基中的细胞数。根据下列方程确定成活百分数：

$$存活率（\%）=\frac{未染色细胞数}{细胞总数}\times100$$

对照细胞和凋亡早期细胞排斥台盼蓝；凋亡晚期和坏死细胞摄取染料并显示为蓝色细胞。

基本方案 2　细胞的差异染色

材料

Cytospin 制备的细胞（见支持方案 1）
100%甲醇
用于差异染色的染料（DiaChem 提供的 RAPI-DIFF 试剂盒也可以）：
　酸性染料：0.1%（w/v）伊红 Y/0.1%（w/v）甲醛/0.4%（w/v）磷酸氢二钠/0.5%磷酸二氢钾
　碱性染料：0.4%（w/v）亚甲基蓝（多色的）/0.4%（w/v）天青/0.4%(w/v)磷酸氢二钠/0.5%（w/v）磷酸二氢钾
DPX 封固剂（溶液；BDH）
盖玻片（如 ChancePropper）
显微镜载玻片（如 Menzel-Glaser）

光学显微镜

1. 将 Cytospin 制备（见支持方案 1）的细胞玻片浸入 100%甲醇中 10 次以固定细胞。
2. 玻片浸入酸性染液中 10 次染细胞核；玻片浸入碱性染液中 10 次染细胞质，然后浸入蒸馏水中漂洗玻片。使玻片在空气中晾干，用 DPX 封固剂封固。
3. 根据光镜下的形态特征，对正常的、凋亡的、浓缩和（或）片段化核，或坏死的膨胀细胞进行计数（表 11.4.1，图 11.4.1）。

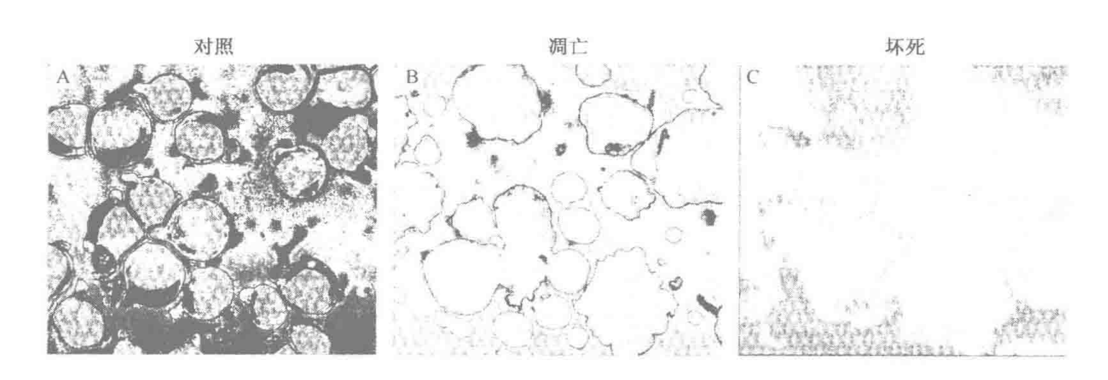


图 11.4.1 Cytospin 制备的 HL-60 细胞的 RAPI-DIFF 染色
细胞用不同浓度的细胞毒药物处理诱导凋亡或坏死
（A）未处理细胞；（B）凋亡细胞；（C）坏死细胞

基本方案 3 细胞的 Hoechst 染色

材料（带√项见附录 1）

细胞悬液
√1×PBS 和 2×PBS，pH7.2～7.4（Sigma 的 2×PBS 药片，或见配方）
√4%（w/v）多聚甲醛
10μg/ml Hoechst 33342 染料（Molecular Probes）溶于 PBS；用避光 4℃保存的 100×储备液稀释
50%/50%（v/v）PBS/甘油
显微镜载玻片（如 Menzel-Glaser）
盖玻片（如 Chance Propper）
荧光显微镜

1. 从细胞悬液中取出含有 0.3×10^6～0.5×10^6 个细胞的等分液滴加入到微型离心管中，4℃，1000*g* 离心 5min。取出并弃上清液，干沉淀重悬于 30～50μl 4%多聚甲醛中。
2. 如支持方案 1 所述，将固定的细胞甩到玻璃片上。也可以用吸管头将细胞分散在玻片上，然后使之空气干燥。

3. 用 10μg/ml Hoechst 染料染玻片。玻片室温下避光放置 10min，然后用蒸馏水浸洗 5 次，空气中避光干燥。
4. 盖上盖玻片，用 PBS/甘油封固。在荧光显微镜下采用蓝色滤片检测荧光，并将含有片段化核的细胞评估为凋亡细胞。

该方法对于区分凋亡细胞和非凋亡（未处理或坏死）细胞很有用。

支持方案 1　Cytospin 制备用于分析的细胞

材料（带√项见附录 1）

细胞悬液
√PBS
Cytospin 离心机和杯子（Shandon/Lipshaw）

1. 将含有约 $0.5\times10^5\sim1\times10^5$ 个细胞的细胞悬液样品加到微型离心管中，4℃，1000 *g* 离心 5min。取出并丢弃上清液，沉淀细胞重悬于 100μl PBS 中。
2. 将悬液加到 Cytospin 杯中，装上玻片，4℃，500 *g* 离心 2min。空气干燥玻片。

染色质裂解分析

染色质裂解是凋亡的标记，涉及高分子质量（＞50kb）和核小体大小（200bp）DNA 片段的形成。

基本方案 4　细胞 DNA 片段化的 TUNEL 分析

凋亡诱导导致单链 DNA 断裂的产生。它们可以用 TdT 介导的 dUTP-生物素缺口末端标记法（TUNEL）来检测。

材料（带√项见附录 1）

细胞悬液
100％甲醇，－20℃
√PBS，pH7.2～7.4
1％（v/v）甲醛
70％乙醇，冰冷
末端脱氧核糖核苷转移酶（TdT；25U/ml）和 10×缓冲液（0.3mol/L Tris 碱/1.4mol/L 二甲胂酸钠，pH7.2/1mmol/L DTT；如 BoehringerMannheim）
25mmol/L $CoCl_2$
1mmol/L Bio-16-dUTP（如 Boehringer Mannheim）
终止缓冲液：300mmol/L NaCl/30mmol/L 柠檬酸钠（如 Sigma 或同等物）
√染色缓冲液

FACS 液（如 Becton Dickinson；可选，用于流式细胞术）
DPX 封固剂（BDH）
5μg/ml 碘化丙啶 PBS 溶液
流式细胞仪（如 Becton Dickinson）和管子；或荧光显微镜
盖玻片（如 Chance Propper）
显微镜载玻片（如 Objekttrager，Menzel-Glaser）

1. 洗涤含有约 10^6 个细胞的细胞悬液样品，4℃ 1000 *g* 离心 5min，弃上清，重悬于 PBS。转移到微型离心管，4℃ 1000 *g* 离心 5min。
2. 去除并丢弃上清液，细胞重悬于 1%甲醛中冰上固定 15min。
3. 4℃ 1000 *g* 离心 5min。去除并丢弃上清液，细胞沉淀重悬于 PBS 中，重复离心。去除并丢弃上清液。
4. 细胞沉淀重悬于 0.5ml PBS，加到 5ml 冰冷 70%乙醇（细胞可以在乙醇中－20℃保存数周）。4℃ 1000 *g* 离心 5min。去除并丢弃上清液，细胞重悬于 PBS，重复离心。
5. 准备延伸缓冲液，即用即配（每个样品 50μl 加 50μl 过量）：
   41.5μl 超纯水
   5μl 10×TdT 缓冲液
   2μl 25mmol/L $CoCl_2$
   1μl 1mmol/L Bio-16-dUTP
   0.5μl 25U/μl TdT 酶
   每个细胞沉淀中加入 50μl 延伸缓冲液，重悬。37℃孵育 30min。
6. 加入 5ml PBS，4℃ 1000 *g* 离心 5min。去除并丢弃上清液，细胞沉淀重悬于 100μl 染色缓冲液，室温孵育 30min。
7. 加 2ml PBS，重悬细胞，4℃ 1000 *g* 离心 5min，去除并丢弃上清液。重复。
8. 加 1ml 5μg/ml 碘化丙啶，室温避光孵育 30min。4℃ 1000*g* 离心 5min，去除上清液。

9a. 用流式细胞术：细胞重悬于足够量的 PBS 或 FACS 液，测量荧光［对于 FICS，488nm 激发，（520±20）nm 发射，FL-1 通道；对于 PI，560nm 激发，640nm 发射，FL-2 或 FL-3 通道］。

9b. 用荧光显微镜：细胞重悬于 50～100μl PBS，如支持方案 1 所述将它们甩到玻片上。用 DPX 封固剂封固玻片，用绿色和红色滤片镜下观察荧光。

单链断裂数量在凋亡的早期增加（绿色荧光增加），而 DNA 含量没有变化（用 PI 染色测量）。随着时间推移，DNA 含量由于凋亡小体的形成而减少（红色荧光），这也导致 TUNEL 信号的减弱。

备择方案 1　石蜡包埋切片的 TUNEL 分析

补充材料（同见基本方案 4；带√项见附录 1）

玻片上的石蜡包埋组织切片
√4%（w/v）多聚甲醛或 4%甲醛 PBS 溶液

96%、90%和80%乙醇
二甲苯
BSA（如Sigma）
√10mmol/L Tris·Cl，pH8.0
20μg/ml蛋白酶K，溶于10mmol/L Tris·Cl
3%（v/v）甲醇
2%（w/v）BSA，溶于PBS
ExtrAvidin-过氧化物酶（Sigma），1∶50稀释于PBS/1%BSA/0.5%Tween20
3-甲基-9-乙基咔唑（AEC）
荧光显微镜
盖玻片（如Chance Propper）
显微镜载玻片（如Objekttrager，Menzel-Glaser）

1. 切片在4%多聚甲醛或甲醛中固定，然后浸入PBS。70℃孵育10min或58～60℃孵育30min来去除切片上的石蜡。
2. 切片重新水化——依次在下列液体中孵育：二甲苯2次，5min/次；96%乙醇2次，3min/次；90%乙醇3min；80%乙醇3min；水3min。使用新鲜的溶剂。
3. 用10mmol/L Tris·Cl，pH 8.0处理切片5min，室温下在20μg/ml蛋白酶K中孵育15min。超纯水中洗涤玻片4次，2min/次。室温下在3%甲醇中孵育切片30min，然后浸入超纯水中漂洗5次。
4. 每张玻片准备100μl延伸缓冲液（见基本方案4，步骤5；缓冲液需要是新鲜的）。在潮湿的空气中37℃孵育切片60min。浸入超纯水中漂洗3次，室温下在终止缓冲液中孵育15min。
5. 将切片依次放入PBS（5min）、2%BSA（10min）、PBS（5min），所有都是室温下操作。室温下在ExtrAvidin-过氧化物酶中孵育切片15min，然后是在2%BSA中，并用PBS洗涤4次。
6. 37℃用AEC染切片30min，浸入超纯水中漂洗3次。封固玻片并观察荧光（加盖的玻片封固后4℃可以保存数月）。

基本方案5　整个细胞DNA片段化的检测

材料（带√项见附录1）

√1×TBE和5×TBE缓冲液，室温下约pH8.0（不要调节pH）
SeaKem GTG琼脂糖（FMC Bioproducts）
细胞悬液
√50mg/ml RNaseA
4×DNA上样缓冲液：含有40%（w/v）蔗糖和0.25%（w/v）溴酚蓝的4×TBE缓冲液（见配方）（如Sigma；4℃保存可达2～3周）
DNA标记VI（用*Bgl*I和*Hin*fI切割的pBR328 DNA；Boehringer Mannheim），

1μl 溶于 20μl 1×DNA 上样缓冲液
√TE 缓冲液，pH8.0
√10mg/ml 溴化乙锭
沸水浴或微波炉
凝胶电泳装置：GNA-100（Amersham Pharmacia Biotech），Buffer Puffer（Owl Scientific），或等同物
电源（Power-Pac 300，Bio-Rad 或等同物）
4℃摇床
MacroVue UV 透照仪（Hoefer Scientific Instruments 或等同物）
Photoman Polaroid 凝胶文件系统（Hoefer Scientific Instruments 或等同物）

1. 准备足够体积的 1×TBE 灌胶并充满电泳槽（槽内与凝胶使用相同批次的缓冲液）。在烧瓶中称量 0.9g SeaKem 琼脂糖，加 50ml 1×TBE（用于 GNA-100 凝胶装置）或称量 2.7g 琼脂糖并加入 150ml TBE（用于 Buffer Puffer）。在沸水浴或微波炉中加热直至溶解，然后将琼脂糖晾凉 10～15min 至 60℃。将胶倒入模具中，赶去不需要的气泡。放置梳齿于胶中，让胶凝结 1h。
2. 将含有 4×10^5～5×10^5 个细胞的样品细胞悬液置于微型离心管，4℃，1000 *g* 离心 3min。小心除去上清，用 16μl 超纯水重悬沉淀。加入 4μl 50mg/ml RNaseA（终浓度为 10mg/ml），混合，室温放置 20min。加入 5μl 4×DNA 上样缓冲液。
3. 用手术刀在梳齿和凝胶上边缘之间切出一块凝胶（不要除去梳齿），保留凝胶第一个或前两个孔上部完整。
4. 对于 GNA-100 装置，称量 40mg 超纯琼脂糖（非 SeaKem），准备 5ml 消化凝胶，加入 2.75ml 超纯水，在热的平台上搅拌使溶解。对于 Buffer Puffer 装置，加倍量，准备 10ml 消化凝胶。
5. 当蒸汽从烧瓶中冒出时，加入 1ml 5×TBE 缓冲液和 1ml 10%SDS。当琼脂糖已经煮沸并溶解时，将烧瓶从加热器上取下，使凝胶冷却至 50℃。加入 250μl 20mg/ml 蛋白酶 K，轻轻混匀，倒进主胶上面的缺口中（步骤 3）。待冷却，移去梳齿。
6. 将凝胶装入电泳槽，加入刚刚足够的 1×TBE 缓冲液使盖过凝胶 1mm 深。在 30μl 1×DNA 上样缓冲液中加入 1μl DNA 标记 VI（Buffer Puffer 装置用 2μl），将标记加入与消化胶分离的孔中。将所有其他样品加入与消化胶连接的孔内，20V 过夜（约 14h）运行凝胶以促进样品的消化，然后将电压上调到 90V，再运行 1.5h。
7. 从槽中取出凝胶并用水漂洗。加入 100ml TE 缓冲液和 40μl 50mg/ml RNaseA。将凝胶放置在摇床上 3～4h。用蒸馏水漂洗凝胶。加入 100ml TE 缓冲液和 5μl 10 mg/ml溴化乙锭。将凝胶放置在摇床上 40min。用新鲜的 TE 洗涤数次以去除溴化乙锭，在紫外灯下照相。

备择方案 2　总基因组 DNA 的 DNA 片段化检测

虽然基本方案 5 和该备择方案是同样灵敏的，但是该方案耗时更少。另外，干法上

样可避免材料损失。

补充材料（同见基本方案5）

裂解缓冲液：2mmol/L EDTA/100mmol/L Tris · Cl，pH8.0（见配方）/0.8%（w/v）SDS（室温保存）

1. 将含有4×10^5～6×10^5个细胞的样品细胞悬液置于1.5ml微型离心管，4℃，2000*g*离心5min。取出并丢弃上清，加入20μl裂解缓冲液和2μl 50mg/ml RNaseA，轻弹管底充分混合（不要涡旋）。37℃孵育至少30min。
2. 加入10μl 20mg/ml蛋白酶K，50℃孵育至少1.5h，然后加入8μl 4×DNA上样缓冲液（如果必要，该步骤后样品可4℃保存至少1周）。
3. 在烧瓶的50ml 1×TBE中放入0.9g SeaKem琼脂糖（1.8%）（用于GNA-100凝胶装置）。在沸水浴或微波炉中加热直至溶解，然后将琼脂糖晾凉10～15min至60℃。加入3μl 10mg/ml溴化乙锭。
4. 干法上样：即在电泳装置中加入缓冲液之前将样品加入凝胶中。30μl 1×DNA上样缓冲液中溶解1μl DNA标记VI，干法上样于凝胶中。装置中加入足够的TBE，使其接触凝胶两侧但不漫过凝胶。采用低电流（约35mA）运行10min使样品进入凝胶，然后停止电流加入更多的TBE使覆盖整块凝胶。重新采用低电流（约35mA）运行至少7h，或用高电流（约60mA）运行4h。凝胶在紫外灯下照相。

备择方案3 检测DNA片段化的简单方案

该简单方案是作者实验室建立的。它对于检测淋巴细胞染色质切割尤其有用（Zhivotovsky et al. 1995），但是对于肝细胞和上皮细胞的用处较小。对于这些类型的细胞，请参见备择方案4。

补充材料（同见基本方案5，带√项见附录1）

裂解缓冲液：2mmol/L EDTA/100mmol/L Tris · Cl，pH8.0（见配方）/0.8%（w/v）SDS（室温保存）
100%乙醇，－20℃
5mol/L NaCl
√RNase T1/A储液
真空冻干机（如Hetovac，Heto-Holten）

1. 将含有1×10^6～2×10^6个细胞的样品置于微型离心管，4℃，2000 *g*离心5min。用1ml PBS重悬沉淀，重复离心。沉淀重悬于250μl TE缓冲液，加入250μl 4℃的裂解缓冲液，涡旋。冷却30min。
2. 4℃ 15 000 *g*离心15min。将上清液转移到新鲜离心管。加入1ml的－20℃乙醇和30μl 5mol/L NaCl。混匀，放在－20℃冰箱过夜。

3. 4℃，15 000g 离心 15min，取出并弃去上清。沉淀放在真空冻干机 20～25min。
4. 加入 20～30μl TE 缓冲液和 1μl RNase T1/A 储液，37℃孵育 1h。加入 1μl 20mg/ml 蛋白酶 K，37℃再孵育 1h，然后加入 8μl 4×DNA 上样缓冲液。
5. 在烧瓶的 50ml TBE 缓冲液中溶解 0.9g SeaKem 琼脂糖（用于 GNA-100 凝胶电泳装置）或 2.7g SeaKem 琼脂糖溶于 150ml TBE 缓冲液（用于 Buffer Puffer 凝胶电泳装置）。在沸水浴或微波炉中加热直至溶解，然后将琼脂糖冷却并倒入模具。
6. 将凝胶装入电泳槽，加入刚刚足够的 1×TBE 缓冲液使盖过凝胶 1mm 深。第一个孔加 DNA 标记 VI，其他孔加样品（见基本方案 5，步骤 6）。
7. 60mA（对于 GNA-100）或 10mA（对于 Buffer Puffer）运行凝胶直至溴酚蓝前沿距离凝胶尽头约 1～2cm。用溴化乙锭染胶并在紫外灯下照相（见基本方案 5，步骤 7）。

备择方案 4　用于琼脂糖凝胶电泳的 DNA 片段的酚抽提

虽然该法需要 DNA 纯化，比其他技术花费时间多得多，并需要准备更多的细胞，但是它可以得到非常干净、无蛋白质的 DNA 片段。

补充材料（同见基本方案 5，带√项见附录 1）

裂解缓冲液：2mmol/L EDTA/100mmol/L Tris · Cl，pH8.0（见配方）/0.8%（w/v）SDS（室温保存）
100%乙醇，−20℃
5mol/L NaCl
√RNase T1/A 储液
√酚，TE 饱和
24：1（v/v）氯仿/异戊醇（混合物室温保存于通风橱）
0.5%（w/v）SDS

1. 将含有 2×10^6～5×10^6 个细胞的样品置于微型离心管中，4℃，2000 g 离心 5min。沉淀重悬于 250μl TE 缓冲液，加入 250μl 4℃的裂解缓冲液，涡旋。4℃冷却 30min。4℃，15 000 g 离心 15min。
2. 将上清液转移到新鲜离心管，加入 1ml 的−20℃100%乙醇和 30μl 5mol/L NaCl。混匀，放在−20℃冰箱过夜。样品 4℃，15 000 g 离心 15min。取出并丢弃上清，沉淀中加入 500μl TE 缓冲液和 5μl RNase T1/A 储液。37℃孵育 30min。
3. 加入 250μl TE 饱和酚和 250μl 24：1 氯仿/异戊醇。涡旋，4℃，5000 g 离心 2～3min。上层转移到新鲜的 2ml 微型离心管中。
4. 下层中加入 500μl TE 缓冲液；重复步骤 3。上层转移到 2ml 微型离心管并与步骤 3 的上层混合。用 1000μl 24：1 氯仿/异戊醇抽提 2 次混合上层的样品，再次离心。
5. 将上层转移到 1.5ml 微型离心管，500μl 每管。如步骤 2 用乙醇和 NaCl 沉淀过夜并离心。将沉淀放入真空冻干机 20～25min。用总体积为 20～30μl TE 缓冲液/0.5%

SDS 溶解并混合两个微型离心管中的沉淀。

6. 0.9g 琼脂糖溶于 50ml TBE 缓冲液（用于 GNA-100 凝胶电泳装置）或 2.7g 琼脂糖溶于 150ml TBE 缓冲液（用于 Buffer Puffer）以制备 1.8%凝胶。将琼脂糖冷却并倒入模具。将凝胶装入电泳槽，加入刚刚足够的 1×TBE 缓冲液使盖过凝胶 1mm 深。
7. 第一个孔加 DNA 标记 VI，其他孔加样品（见基本方案 5，步骤 6）。60mA（对于 GNA-100）或 10mA（对于 Buffer Puffer）运行凝胶直至溴酚蓝前沿距离凝胶尽头约 1～2cm。用溴化乙锭染胶（见基本方案 5）并在紫外灯下照相。

基本方案 6　DNA 片段的定量分析

该法不能区分凋亡和坏死的染色质裂解。

材料（带√项见附录 1）

待测细胞悬液
裂解缓冲液：2mmol/L EDTA/100mmol/L Tris·Cl，pH8.0（见配方）/0.8%（w/v）SDS（室温保存），冰冷
10%（w/v）和 5%（w/v）三氯乙酸（TCA；室温避光保存）
√二苯胺试剂
10ml 锥形玻璃管
玻璃弹子
水浴，100℃

1. 准备 1ml 含有 1×10^6～10×10^6 个细胞的细胞悬液。将 0.8ml 细胞悬液转移到微型离心管，加入 0.7ml 冰冷裂解缓冲液，涡旋，4℃放置 15～30min 使裂解。
2. 4℃，15 000 *g* 离心 15min。上清转移到作过标记的锥形玻璃管中。向在微型离心管中的沉淀加入 0.65ml 5%TCA，向标记的玻璃管中的样品加 1.5ml 10%TCA。
3. 两个样品都在 4℃沉淀过夜（至少 4h）。锥形管室温 2500 *g* 离心 10min。去除上清，沉淀中加入 0.65ml 5%TCA。准备两个空管装 0.65ml 5%TCA，在剩余步骤中作同样处理。
4. 在步骤 5 中每个微型离心管的顶部钻孔，用一个玻璃弹子盖住每个锥形管。两组管子都在 100℃水浴中煮 15min，冷却到室温。室温下 2500 *g* 离心 5min。
5. 将每个上清的 0.5ml（从玻璃管和微型离心管）转移到作过标记的圆形玻璃试管中。每管加入 1ml 二苯胺试剂。每管都用一个弹子盖住，37℃孵育至少 4h。
6. 在分光光度计上读出 600nm 处的吸收值。用步骤 3 的空白设置零点。以 DNA 片段化百分数表示结果：

$$\text{片段化 DNA（\%）} = \frac{\text{上清液吸收值}}{\text{上清＋沉淀吸收值}} \times 100$$

基本方案7 用脉冲场琼脂糖凝胶电泳检测高分子质量染色质片段

材料（带√项见附录1）

细胞悬液

√琼脂糖缓冲液（用于模具）

SeaPlaque GTG低熔点琼脂糖（FMC Bioproducts）

20mg/ml蛋白酶K水溶液（分装保存于-20℃可达1年）

√蛋白酶缓冲液（用于填充胶）

√TE缓冲液，pH8.0

√50mmol/L EDTA，pH8.0

SeaKem GTG琼脂糖（FMC Bioproducts）

√5×TBE缓冲液

DNA尺寸脉冲标记：酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）的染色体（225～2200kb）和混合物：λDNA*Hin*dIII片段、λDNA和λDNA串联体（0.1～200kb；Sigma；预制在注射器内供应）

凝胶水平桌

100μl插入模子（Amersham Pharmacia Biotech），保存于0.1mol/L HCl

12或24孔组织培养板

50℃孵箱

100℃水浴或微波炉

脉冲场凝胶电泳系统：具有冷凝部件的垂直凝胶室（ProteanII，Bio-Rad）；水平凝胶室（HE100B）；电源（PS500XT）；之字形脉冲控制器（PC500，Hoefer Scientific Instruments）

恒温循环仪Multi TempIII（Amersham Pharmacia Biotech）

1. 在大量蒸馏水中漂洗插入模具并使干燥。在模具底部包裹封口膜，灌胶前将它们置于冰上至少冷却10min。用铅笔或钢笔标记样品管。
2. 将含有1×10^6个细胞的细胞悬液样品置于微型离心管中，4℃，2000 *g*离心3min。取出并丢弃上清液，沉淀重悬于100μl琼脂糖缓冲液中。
3. 用琼脂糖缓冲液制备1%低熔点凝胶，放在60℃水浴中直至溶解。将100μl溶化的1%琼脂糖加入到细胞悬液中，用吸管混匀。快速将混合物吸入两个预冷的插入模具中，每个模具100μl。
4. 将充满的插入模具放在冰上10～15min。从插入模具的底部除去封口膜，卸下每个小块放入12或24孔组织培养板的单个孔中。
5. 每孔中加入1ml蛋白酶缓冲液和10μl蛋白酶K（终浓度为每毫升填充胶含0.2mg）。平板周围用封口膜或干净的胶带包裹，在摇床上50℃孵育至少24h。
6. 从平板上除去包裹物，用吸管吸出缓冲液。用1ml TE缓冲液洗涤填块3次，每次

2h，4℃摇床。去除 TE 缓冲液，加入 1ml 50mmol/L EDTA。如果必要，在 EDTA 中填块保存在 4℃，这样 DNA 可以稳定数月。

对于水平凝胶

7a. 在沸水浴或微波炉中，将 2.5g 琼脂糖溶于 250ml 0.5×TBE。琼脂糖冷却 10～15min 至 60℃。用胶带封住凝胶平台的四周，将平台置于水平桌上。

8a. 将凝胶注入模具，去掉不要的气泡。梳齿放入凝胶，使凝固 1h。非常小心地取下梳齿以防凝胶破碎。去除胶带。前进到步骤 9。

对于垂直凝胶

7b. 将两块冷冻的玻璃板夹在一起，中间放置 3mm 间隔条。用封口膜封住底部以防温热琼脂糖渗漏。玻璃板在 50℃孵箱内保温 30min。

8b. 如步骤 7 溶解琼脂糖（1g 琼脂糖溶于 100ml 0.5×TBE），注入预热的凝胶装置，使胶距离板上沿约 5mm。将梳齿插入凝胶，使凝固 1h。非常小心地取下梳齿以防凝胶破碎，用 0.5×TBE 洗涤各孔以去除部分聚合的琼脂糖。前进到步骤 9。

9. 用手术刀从一个标记上切出 2mm 的小块，用药匙将其插入凝胶第一个孔中。第二个标记则重复该过程。确定小块位于孔底处是平的；这也适用于样品的加入（步骤 10）。

10. 为了加入样品，从样品块上切出 3mm，将其用药匙插入单独的孔中。所有样品都重复相同的过程。避免将任何气泡带入孔内。注意并记录样品的顺序。

11. 用仍然溶解的 1%琼脂糖将小块贴铸于孔内。将上好样的凝胶（不管是水平的还是垂直的）转移到装有 0.5×TBE 的、预冷的（11～12℃）电泳槽内。

12. 恒压运行凝胶，采用适合的转换程序以取得预期的结果。表 11.4.2 中列出的程序对于 50kb、300kb 和 700kb 片段都可得到良好的分辨率。

13. 小心取出凝胶，用溴化乙锭染色 1h（见基本方案 5）。用 0.5×TBE 脱色 2～3h。在紫外灯下观察并给条带照相。

表 11.4.2　脉冲场凝胶电泳的相关参数

	水平凝胶	垂直凝胶
运行电压[a]	170V	200V
程序	10min：采用连续向前脉冲使 DNA 在胶中运行	10min：采用连续向前脉冲使 DNA 在胶中运行
	6h：采用 20s 前进时间，3∶1 前进/后退比，斜率系数 1.5[b]	2h：采用 12s 前进时间，3∶1 前进/后退比，斜率系数 2[c]
	6h：采用 10s 前进时间，3∶1 前进/后退比，斜率系数 2	3h：采用 2.4s 前进时间，3∶1 前进/后退比，斜率系数 5.0
	12h：采用 0.8s 前进时间，3∶1 前进/后退比，斜率系数 12.5	2.5h：采用 8.0s 前进时间，3∶1 前进/后退比，斜率系数 3.0
运行总时间	24h，10min	7h，40min

a. 恒压。

b. 其意思是，在这 6h 之后，前进时间应该是 30s。

c. 其意思是，在这 2h 之后，前进时间应该是 24s。

参考文献：Anand and Southern，1990；Darzynkiewicz et al.，1994
撰稿人：Boris Zhivotovsky and Sten Orrenius

单元 11.5 细胞凋亡期间 Caspase 活化分析

caspase 是细胞内半胱氨酸蛋白酶，它们以酶原的形式合成，然后在凋亡早期被蛋白裂解活化。

基本方案 1 Caspase 活性的酶促分析

注意： Caspase 的荧光和生色底物在许多供应商处都可买到，包括 Bachem Bioscience，Biomal Research Laboratories，Calbiochem-Novabiochem，Molecular Probes 和 Osaka Peptide Institute。底物和标准品的储备液以 20mmol/L DMSO 溶液制备，分装保存于－20℃可达 1 年。

材料（带√项见附录 1）

感兴趣的细胞和培养基
凋亡诱导刺激物
√CMF-DPBS，冰冷
√裂解缓冲液，4℃
√0.5mol/L EDTA，pH7.4
√1mol/L 二硫苏糖醇（DTT）
5mmol/L EDTA（pH7.4）/1mmol/L DTT，溶于裂解缓冲液，冰冷
20 mmol/L（14.6mg/ml）乙酰-Asp-Glu-Val-Asp-7-氨基-4-三氟甲基香豆素（乙酰-DEVD-AFC；Biomol），或其他 caspase 的荧光和生色底物，溶于二甲亚砜（DMSO）
√HEPES/CHAPS 缓冲液，室温和冰冷
10 mmol/L（4.6mg/ml）7-氨基-4-三氟甲基香豆素（游离 AFC；Sigma），或其他底物合适的标准，溶于 DMSO
细胞刮刀（可选）
2ml（总体积）紧贴的 Dounce 匀浆器
BechmanTL100 超速离心机和 TL100.2 转子或同等物，4℃，以及合适的超速离心管
荧光计

1. 将那些分析开始前自发凋亡的细胞除去。对于贴附细胞系，轻拍含有感兴趣细胞的培养瓶并更换培养基以去除死细胞。对于非贴附细胞系，用 Ficoll-Hypaque 密度沉淀去除死细胞（单元 2.2）。

2. 用合适的凋亡诱导刺激物处理细胞或者假处理。每个时间点用 1×10^8～3×10^8 个细胞作为处理和对照。
3. 每个时间点收集细胞。对于贴附细胞，用细胞刮刀或胰蛋白酶消化（单元 1.1），使细胞从基层上释放出来。确定收集那些在处理过程中脱离的细胞，因为它们可能也是凋亡的。
4. 将细胞转移到 50ml 锥形离心管，室温 200 *g* 离心 10min。去上清，细胞重悬于 10ml 冰冷的 CMF-DPBS 中，室温 200 *g* 离心 10min。重复 1 次。

   所有下面的步骤应该在 4℃进行，除非另行提示。
5. 去上清，沉淀重悬于 1ml 冰冷的裂解缓冲液。样品冰置 20min，然后用 2ml 紧贴的 Dounce 匀浆器裂解细胞。确定细胞裂解的效果：将 3～5μl 细胞液和等体积 0.4%（w/v）台盼蓝（溶于 Hanks 平衡盐溶液）混合并在血球计数板上检查（单元 1.1；如果质膜已成功破裂，细胞核将染成蓝色）。继续匀浆直至超过 95%的细胞核染成蓝色。
6. 匀浆液转移到合适的管中，4℃，800 *g* 离心 10min 或者 16 000 *g* 离心 3min 以去除细胞核。将去核上清液转移到超速离心管。加 0.01 体积的 0.5mol/L EDTA，pH7.4。
7. 去核上清液在带 TL100.2 转子的 Beckman TL100 超速离心机中，以 4℃，280 000 $\times g_{max}$离心 60min。收集上清液（细胞溶质），取一小份检测蛋白质浓度（附录 3B）。剩余的细胞溶质中加入 1mol/L DTT 至终浓度为 1mmol/L。将细胞溶质以 50μl 等分保存于－70℃。
8. 4℃溶解样品等分，将含 50μg 细胞溶质蛋白的液体转移到一个微型离心管。用冰冷 50mmol/L EDTA（pH7.4）/1mmol/L DTT 裂解缓冲液将其稀释到 50μl。加 50μl 冰冷 50mmol/L EDTA（pH7.4）/1mmol/L DTT 裂解缓冲液到另一个微型离心管，作为阴性对照反应平行处理。
9. 准备 100μmol/L 乙酰-DEVD-AFC（溶于 HEPES/CHAPS 缓冲液，即用即配），每管加入 225μl。37℃水浴孵育 2h。加入 1.225ml 冰冷 HEPES/CHAPS 缓冲液（终体积 1.5ml）并将样品放在冰上以停止反应。
10. 将 10mmol/L 游离的 AFC（溶于 DMSO）加入一系列管子中，建立一定范围浓度的标准曲线。将 0～1500pmol 游离 AFC 溶于 50μl 5mmol/L EDTA（pH7.4）/1mmol/L DTT 裂解缓冲液中。加入 1.45ml HEPES/CHAPS 缓冲液（终体积 1.5ml，含 0～1μmol/L AFC）。
11. 在荧光计上测量所有样品的荧光，其激发波长用 400nm，发射波长为 505nm。用已知量游离 AFC 的荧光强度制备标准曲线。比较细胞提取物的荧光值来确定每个样品中释放出的 AFC 绝对量。
12. 每个值都要减去试剂空白（步骤 8）释放 AFC 的量来计算酶所介导的释放。通过将数据表示为每单位蛋白质单位时间释放产物量，将结果转化为活性测量结果。

基本方案 2　用免疫印迹检测 Caspase 活性

材料（带√项见附录 1）

√CMF-DPBS，冰冷

无血清组织培养基（适合于感兴趣的细胞），冰冷，可选

√SDS 样品缓冲液

固绿（fast green）染液：0.1%（w/v）固绿 FCF/20%（v/v）甲醇/5%（v/v）乙酸

固绿脱色液：20%（v/v）甲醇/5%（v/v）乙酸

√封闭缓冲液

抗 caspase 第一抗体

√PBST

合适的第二抗体，偶联辣根过氧化物酶（HRP）、碱性磷酸酶（AP）或放射性标记

3%（w/v）脱脂奶粉，溶于 CMF-DPBS

增强化学发光试剂（如 Amersham Pharmacia Biotech 的 ECL），用于 HRP 偶联的第二抗体

细胞刮刀（可选）

配有微型探头的超声仪（如 Branson）

70～100℃水浴或加热器

X 射线胶片

1. 将预期数量的细胞（对于每个处理样品而言需要 1×10^6～10×10^6 个细胞，使可多次重复凝胶）进行凋亡刺激或假处理（见基本方案 1，步骤 1 和 2）。
2. 收集细胞（见基本方案 1，步骤 3），转移到 15ml 锥形离心管。室温 400 *g* 离心 10min。去上清，细胞重悬于 10～15ml 冰冷的 CMF-DPBS 或无血清组织培养基中。
3. 对样品中的细胞进行计数（单元 1.1）。室温 200～400 *g* 离心 10min。去上清，不要搅动细胞沉淀。
4. 每 2×10^5～5×10^5 个细胞加入 20μl SDS 上样缓冲液。剧烈涡旋样品。用配有微型探头的超声仪给予样品 40 个脉冲（40%最大功率输出，每个脉冲 0.33s）剪切 DNA。如果样品将按蛋白质浓度上样，则取出小份液滴用于蛋白质分析（附录 3B）。将样品冻存（不确定）于－80℃或立即进行步骤 5。
5. 样品用水浴或加热器在 70℃加热 20min 或 100℃加热 3min。立即将含有 2×10^5～5×10^5 个细胞的样品加入具有合适分离能力的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶的泳道内（单元 7.1）。

   由于活化 caspase 的亚基大小为 10～12kDa 和 16～35kDa，所以需要采用分离该分子质量范围的凝胶。如果采用标准的 30：0.8 丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺比值，则分离上述分子质量范围需采用含有 12%～16%丙烯酰胺的凝胶。另外，5%～15%或 5%～20%梯度凝胶也足以分离 caspase，也可以用于它们底物的免疫分析。

6. 样品进行电泳（单元7.1）和电转移（单元7.7）到硝酸纤维素膜或PVDF膜上。用固绿染液染色1min以确定样品蛋白质同等转移。在固绿脱色液中作短暂漂洗以去除未结合染料。膜在CMF-DPBS中漂洗数次去除残余的乙酸。
7. 膜在室温下轨道平板摇床上的封闭缓冲液中孵育，封闭未占据的蛋白质结合位点（对于PVDF膜转移后立即封闭；硝酸纤维素膜可以干燥并在以后封闭）。
8. 根据产品说明书用封闭缓冲液稀释抗caspase一抗。膜孵育于稀释的一抗中，在室温下轨道平板摇床上过夜。取出一抗，保存于4℃以备后用。
9. 用100ml PBS-T（对于一张20cm×20cm的膜）洗膜3次，每次15min，然后用100ml CMF-DPBS洗膜2次，每次5min。
10. 根据产品说明书，用3%（w/v）脱脂奶粉CMF-DPBS溶液稀释合适的二抗。膜放入稀释的二抗中，放在轨道平板摇床上室温孵育1h。对于HRP偶联的抗体要避免叠氮钠。
11. 弃二抗，用100ml PBS-T如下述进行洗涤：
    2次，每次5min
    2次，每次15min
    2次，每次5min
12. 对于HRP-或AP-偶联的二抗，根据增强化学发光试剂的产品说明书操作。对于放射性标记抗体，将膜对X光片曝光适当长的时间。

备择方案1　盐酸胍裂解细胞用于免疫印迹

注意：由于碳碘键的光敏性，所以所有涉及碘乙酰胺的步骤都应该在柔和的光线下进行。2-ME在通风橱内使用。

补充材料（同见基本方案2；带√项见附录1）

√盐酸胍裂解缓冲液
√100mmol/L PMSF
2-巯基乙醇（2-ME）
1.54mol/L（285mg/ml）碘乙酰胺，溶于盐酸胍裂解缓冲液，新鲜配制
√4mol/L脲（从8mol/L脲稀释；见配方），溶于50mmol/L Tris·Cl，pH7.4（4℃测；见配方）
0.1%（w/v）SDS
1cm透析管（MWCO8000～10 000），一端系双结和透析夹

1. 如前所述，将感兴趣的细胞进行凋亡诱导或假处理，收集和洗涤（见基本方案2，步骤1～3）。第二次离心后尽量多地去除上清液。
2. 在1ml盐酸胍裂解缓冲液中加入10μl 100mmol/L PMSF和10μl 2-ME。立即将该混合物加入沉淀中，剧烈涡旋。用配有微型探头的超声仪给予样品40个脉冲（40%最大功率输出，每个脉冲0.33s）剪切DNA。

3. 每个样品中加入 0.1 体积 1.54mol/L 碘乙酰胺的盐酸胍裂解缓冲液。室温孵育 1h，然后加入 0.01 体积 2-ME。
4. 样品转移到一定长度、一端打结的 1cm 透析管中，用透析夹关闭管子。样品 4℃对 10～100 体积冰冷的 4mol/L 脲/50mmol/L Tris・Cl，pH7.4 透析（附录 3C），更换透析液 4 或 5 次，每次至少 90min。然后 4℃对 10～100 体积 0.1%SDS 透析，更换透析液 3 次，每次至少 90min。
5. 样品转移到 2ml 微型离心管。取出一小份，测量蛋白质浓度（附录 3B）。测量并记录剩余样品的体积，然后冻干，－20℃可保存达 5 年。
6. 用 SDS 上样缓冲液重溶冻干的样品，使蛋白质浓度为 5mg/ml，转移 10～15μl 到一个微型离心管，如前所述继续分析（见基本方案 2，步骤 5～12）。

支持方案 1　从印迹上去除（剥离）第一抗体和第二抗体

为了用不止一种抗体溶液在膜上探测，去除抗体但不去除原始转移到印迹上的蛋白质有时显得很有用。

材料（带√项见附录 1）

结合有抗体的硝酸纤维素或 PVDF 膜（见基本方案 2 或备择方案 1）
√印迹擦除缓冲液
√CMF-DPBS
可再次封口的塑料袋
65℃水浴

1. 将结合有抗体的硝酸纤维素或 PVDF 膜放进可再次封口的塑料袋中。加入 50ml 印迹擦除缓冲液（用于 20cm×20cm 的膜），将袋子封口。
2. 65℃水浴孵育 20～30min，每 5～10min 轻轻搅动。弃擦除缓冲液，用 50～100ml CMF-DPBS 洗涤 2 次，每次 5min。
3. 按照基本方案 2，步骤 7～12 所述重新对膜进行杂交。

基本方案 3　用生物素化底物类似物标记和检测活化的 Caspases

材料（带√项见附录 1）

√不完全 KPM 缓冲液，4℃
√完全 KPM 缓冲液，4℃
100 μmol/L *N*-（*N*$^{\alpha}$-苄氧基羰基谷氨酰-*N*$^{\varepsilon}$-生物素化赖氨酸）天冬氨酸［（2，6-二甲苯基）氧基］甲基酮｛*N*-（*N*$^{\alpha}$-benzyloxycarbonylglutamyl-*N*$^{\varepsilon}$-biotinyllysyl）aspartic acid［（2，6-dimethylbenzoyl）oxy］methylketone｝［z-EK（bio）D-amok；Osaka Peptide Institute］，溶于二甲亚砜（DMSO），分装－80℃保存可达 2 年

√3×SDS 上样缓冲液

5%（w/v）脱脂奶粉 PBS-T 溶液

√PBS-T

过氧化物酶偶联的链亲和素（Amersham Pharmacia Biotech）

增强化学发光试剂（如 Amersham Pharmacia Biotech 的 ECL）

细胞刮刀（可选）

8mm×34mm 聚碳酸酯超速离心管（如 Beckman）

Beckman Optima TLX 台式超速离心机和 TL100.1 转子或同等物，4℃

1. 将约 8×10^{6} 个感兴趣的细胞在预计的浓度下进行合适的凋亡诱导和假处理（见基本方案 1，步骤 1～2）。包括一个含有非凋亡细胞的对照，这样就可以区分用 z-EK（bio）D-amok 标记的和内源生物素化的蛋白质。
2. 在合适的时间点，将细胞收集到 15ml 管中，如果是贴附细胞，用胰蛋白酶（单元 1.1）或刮刀使其从基底释放。

   所有以下与亲和标记试剂预孵育的步骤应该在 4℃进行。
3. 4℃300 *g* 离心 5min。轻柔地将它们重悬于 5～10ml 不完全 KPM 缓冲液，再次离心。轻柔地将细胞沉淀重悬于 1ml 完全 KPM 缓冲液，转移到 1.5ml 微型离心管。4℃800 *g* 离心 3min。去上清，细胞沉淀重悬于约等于沉淀体积的完全 KPM 缓冲液中。
4. 裂解细胞，用液氮（或干冰）冰冻细胞然后在 37℃水浴中孵育直至溶解，如此 3 个循环。裂解的细胞转移到 8mm×34mm 聚碳酸酯超速离心管，在带有 TL100.1 转子的 Beckman Optima TLX 台式超速离心机上以 4℃，157 000×g_{max}离心 1h。
5. 将净化的裂解液转移到 0.5ml 微型离心管。测量蛋白质浓度（附录 3B）。用完全 KPM 缓冲液稀释裂解液至最终蛋白质浓度为 5mg/ml。分装为 200μg 等份保存于－80℃可达 2 个月。
6. 将一个等份在冰上溶解。40μl 裂解液（200μg）中加入 0.4μl 100μmol/L z-EK（bio）D-amok。完全混匀样品，避免形成气泡，37℃孵育 5min。加入 25μl 3×SDS 上样缓冲液，煮沸样品 5min。
7. 上样（10～40μg 蛋白质）于 16%SDS 聚丙烯酰胺凝胶（单元 7.1）。电转移到硝酸纤维素膜上（单元 7.7）。
8. 膜在室温下 5%脱脂奶粉 PBS-T 溶液中孵育 1h，封闭未占据的结合位点。用 PBS-T 洗膜，15min 1 次，5min 2 次。
9. 用 PBS-T 按 1∶3000 稀释过氧化物酶偶联的链亲和素，室温下在该溶液中膜孵育 3.5h。用 PBS-T 洗膜，15min 1 次，5min 4 次，去除为结合的过氧化物酶偶联链亲和素。根据供应商的描述用增强化学发光试剂使结合的链亲和素可视化。

备择方案 2　用亲和标记测量天然裂解液中的 Caspase 体外活化

对于估计非凋亡细胞裂解液活化 caspase 途径的能力，有时很有用。它可以通过将裂解液与已知可以活化 caspase 级联的试剂一起孵育来实现。

补充材料（同见基本方案3；带√项见附录1）

√不完全KHM缓冲液，4℃

√完全KHM缓冲液，4℃

5μg/ml活化的caspase-8（BD PharMingen）溶于完全KHM缓冲液或5mg/ml细胞色素c（Sigma）溶于完全KHM缓冲液

10mmol/L dATP（Sigma）溶于完全KHM缓冲液，pH7.4，可选

100μmol/L N-(N^{α}-benzyloxycarbonylglutamyl-N^{ϵ}-biotinyllysyl) aspartic acid [(2,6-dimethyl-benzoyl) oxy] methylketone [z-EK (bio) D-amok; Osaka Peptide Institute]，溶于二甲亚砜（DMSO），分装－80℃保存可达2年

1. 准备非凋亡细胞（即未处理细胞；见基本方案3，步骤1～5）裂解液，整个过程分别使用不完全和完全KHM缓冲液替代不完全和完全KPM缓冲液。
2. 8μl（40μg）细胞裂解液中加入10μl 5μg/ml活化的caspase-8的完全KHM缓冲液或5mg/ml细胞色素c的完全KHM缓冲液，和2μl 10mmol/L dATP（可选）。充分混合并避免产生气泡，37℃孵育1h。
3. 加入0.2μl 100μmol/L z-EK（bio）D-amok DMSO溶液。混合样品，37℃孵育5min。加入10μl 3×SDS上样缓冲液，煮沸样品5min。如前所述电泳并检测生物素化的物质（见基本方案3，步骤7～9）。

支持方案2　亲和标记活化Caspase特异性控制

用caspase抑制剂可以竞争性抑制亲和标记的结合。例如，用特定肽氯甲基酮或氟甲基酮对裂解液进行预孵育，则可以完全消除后续z-EK（bio）D-amok的标记。该类型的竞争性试验可用于两个目的。第一，细胞裂解液中含有许多内源性生物素化的多肽。它们不会受裂解液与100μmol/L乙酰-Tyr-Val-Ala-Asp-氯甲基酮（乙酰-YVAD-CMK）预孵育的影响，而caspase的标记在相同条件下则被完全抑制。第二，同样的方法有时可以应用于确定标记的caspase行使某种特殊的生物学功能。例如，研究显示来源于兔痘病毒的SPI-2 serpin以及负责核纤层蛋白A（laminA）切割位点的非衍生肽——两种不同类型的可逆caspase抑制剂，均可抑制lamin体外切割，并自发抑制一种特定caspase的亲和标记物。在进行后一类型的实验时，优化标记条件使暴露于亲和标记试剂的时间最短（如1min）显得很重要。因为可逆抑制剂不断地分离和重新结合于caspase活性位点（因此为亲和标记物提供了结合的机会），所以长时间标记可导致caspase的共价修饰，即使是在有效的可逆抑制剂存在的情况下。

支持方案3　d-生物素存在时将膜剥离用于抗体再次杂交

补充材料（同见基本方案3）

含有亲和标记caspase的膜（见基本方案3）

2mmol/L d-生物素（Sigma），溶于 PBS-T（PBS-T 见配方）

1. 将含有亲和标记 caspase 的膜用 50ml PBS-T（对于 6cm×8cm 的膜）洗涤 2 次，每次 15min。
2. 膜放入 2mmol/L d-生物素的 PBS-T 溶液，室温孵育 1h。用 PBS-T 洗涤，15min 1 次，5min 2 次。如果需要，膜干燥室温保存可达 6 个月。
3. 如基本方案 2，步骤 8～12 所述，用合适的抗体进行免疫印迹。

参考文献：Enari et al.，1996；Schlegel et al.，1996；Takahashi et al.，1996

撰稿人：Scott H. Kaufmann，Timothy J. Kottke，L. Miguel Martins，Alexander J. Henzing，and William C. Earnshaw

（赵永娟 译）

第12章　体外重建

细胞生物学家们将体外体系作为各种分子的生物化学研究与完整细胞的复杂生物学研究之间的有效媒介。利用体外体系可在多个水平上研究细胞的功能。一种情况是使用细胞提取物，即提取物中无细胞结构，但保留了复杂的生化活性。对下述过程的体外分析研究即属于这种情况，如蛋白质翻译（单元12.1）、蛋白质共翻译转运进入微粒体（单元12.3）、蛋白质翻译后转运进入叶绿体、DNA复制、mRNA转录以及mRNA拼接等。另外的情况是利用去垢剂、物理破坏或细菌毒素的作用使细胞质膜通透。这种选择性的透化处理可以保存完整的细胞结构。当加入外源的细胞胞液成分时，被通透的细胞便可重建膜转运（单元12.2）、核蛋白输入（单元12.4）、过氧化物酶体蛋白输入以及其他蛋白质运输途径。一些体外系统甚至不仅可以重建生化功能，而且可以重建结构。一个典型的实例是在非洲爪蟾的卵提取物中（单元12.5，单元12.6，单元12.7，单元12.8）加入适当的模板，如精子染色质，便能装配形成核或者有丝分裂纺锤体。

基于细胞裂解物的翻译体系是最早发展的真核体外操作技术之一。近些年，该体系已经成为细胞生物学研究中许多广泛使用的通用方法的基础。单元12.1给出了制备和使用麦胚提取物和依赖信使的网织红细胞裂解物的方案。当噬菌体RNA聚合酶转录形成的mRNA被引入到麦胚提取物或网织红细胞裂解物中，这些体系能够高效地进行翻译，并产生单一种类的被标记蛋白产物。此外，还发展了一些方法，能够在一个体系中同时完成转录和翻译过程，这使由克隆的DNA进行的蛋白质表达可以很方便地用于其他实验。但是，网织红细胞的翻译体系并不是总能给出像其他哺乳动物细胞那样典型的结果，也许是由于该细胞特殊的生物学特性所致。尤其是翻译起始位点的选择，在这个系统中不是很严格。

毋庸置疑，体外翻译体系（单元12.1）已经成为蛋白质翻译研究本身不可缺少的部分。基于此点已经发展了分析翻译复合物的方法，即监控在蔗糖梯度溶液中核糖体、翻译因子和RNA的沉降情况。这些方法在80S起始复合物形成的中间步骤的分析中被证明是非常有效的。它们也已经被用于检测在细胞培养体系中不同条件下翻译起始或延伸的速率变化。麦胚提取物和网织红细胞裂解物还可与来自于与粗面内质网的膜泡结合，使其中的分泌蛋白、腔内蛋白及膜整合蛋白进行共翻译跨膜转运（单元12.2），这使其应用范围进一步扩大。在这个体系中，通过膜运输的重建可对信号肽序列的酶解切割、插入膜后蛋白质的解剖学定位以及N-连接糖基化等过程进行分析。

蛋白质由内质网到高尔基体之间的运输过程已经采用半完整的细胞或微粒体膜等材料（单元12.3）实现重建。为了追踪这一途径中囊泡的运输过程，所有实验均使用了水泡性口炎腔病毒（vesicular stomatitis virus）糖蛋白的温度敏感性突变体VSV-G ts045。在限定温度下，该糖蛋白由于呈非正常折叠状态而留存于内质网内。当细胞置

于允许温度时，VSV-G ts045 蛋白将同步进行移出内质网和进入高尔基体的转运，这一过程可通过糖蛋白所连接寡糖链的成熟状态来进行检测。在采用半完整细胞的实验中，表达 VSV-G ts045 蛋白的细胞在限定温度下被通透，导致细胞胞质成分的丢失。当将这些透化的细胞置于允许温度下并与外源的细胞液孵育时，VSV-G ts045 蛋白将从内质网转运到高尔基体。这个体系可对细胞质成分、突变蛋白以及由内质网到高尔基体转运过程中的分子调控等进行直接的生化分析。在使用微粒体膜作为材料的实验中，则可以单独地对囊泡从内质网的出芽以及与高尔基体的融合过程进行生化研究。

人们采用半完整细胞成功地研究了另一个重要的蛋白质转运过程，即蛋白质从细胞质向细胞核的转运（单元 12.4）。DNA 通过区域化被包裹于细胞核中是真核细胞的重要特征。将遗传物质与翻译系统和细胞质蛋白分隔开有利于确定核区域的特性，也有利于调节其活性，即通过限制转录调控因子进入细胞核来调控基因的表达，进而调节细胞核活性。输入细胞核的蛋白质具有核定位序列（NLS），它可通过受体介导过程特异性地将蛋白质靶向输入到细胞核。利用洋地黄皂苷对细胞进行透化的方法，已将蛋白质入核过程进行体外重建。经洋地黄皂苷处理的细胞，核被膜保持完整，而质膜被破坏，使蛋白质入核所需的可溶性因子被释放。利用洋地黄皂苷处理细胞进行蛋白质入核过程的重建，是通过使不同来源的可溶性因子（网织红细胞裂解物、HeLa 细胞裂解物和非洲爪蟾卵母细胞细胞液）重新输入细胞核来实现的，同时可通过对荧光标记的输入蛋白在核内积聚情况的检测来对转运过程进行监控。

人们利用非洲爪蟾独特的生物学特性，将其作为体外体系，可重建早期发育过程中细胞行为的诸多方面，包括细胞核或有丝分裂纺锤体等结构的从头组装。从非洲爪蟾卵得到的提取物能够重现精原核结构的组装，并形成具有功能的核（单元 12.5），包括具有功能性核孔的双层核被膜的存在、完整的核纤层的存在以及核结构完成一次完整的 DNA 半保留复制的能力。稍微改变一下制备的条件，即可获得分裂期卵提取物，它可利用加入的精子染色质，组装出完整的有功能的纺锤体（单元 12.7）。此外，通过优化翻译条件，有可能获得能够在间期和分裂期之间自发和连续交替进行的提取物（单元 12.6）。这些周期提取物不仅保留了进出有丝分裂的大部分关键环节，而且也保留了掌控这些转换的调节机制。综合而言，这些特点使非洲爪蟾卵提取物成为进行细胞周期研究的一种极为有效的体系。特别是当人们证实了卵提取物也可在试管中实现细胞程序化死亡（细胞凋亡）的功能性重建后（单元 12.8），卵细胞提取物便被赋予了更新的用途。

利用破碎后的细胞复合物已经可以重建正常情况下发生于细胞核内的活动。为了确定转录过程所需的因子并对其生化特性进行研究，已将 RNA 聚合酶Ⅱ催化的转录过程进行了体外重建。单元 12.9 给出了制备和使用哺乳动物细胞（HeLa 细胞）和果蝇提取物的方法，这些提取物可准确启动未激活的和激活的 RNA 聚合酶Ⅱ的转录。这些系统可用于分析以染色质或裸 DNA 为模板的转录过程。由于这些体系在体外可忠实地再现转录过程，使得它们不仅可进行转录机制的分解研究，也可进行转录调控方式的分解研究。

本章各单元较全面地囊括了细胞生物学体外重建技术。尽管这些系统不能代替体内实验，但可以进行直接的生化操作和分析。因此，它们成为致力于探讨细胞活动的生物

学家们不可缺少的工具。

单元 12.1 体外翻译

警告：进行放射性操作时，请采取适当的防护措施以防实验者或环境的污染。请按照当地放射性安全管理部门的规章制度在指定的区域内进行实验操作和处理废物。

基本方案 1 制备和使用依赖 mRNA 的兔网织红细胞无细胞翻译体系

注意：所有使用活体动物的方案必须首先通过动物保护和使用委员会（IACUC）的审查和批准，或者必须遵守政府有关实验室动物保护和使用的规定。

材料（带√项见附录 1）

雌性新西兰白兔，2～3kg
√2.5％（w/v）苯肼
100mg/ml 盐酸氯胺酮
20mg/ml 盐酸赛拉嗪
500U/ml 肝素，灭菌水配制（－20℃保存）
70％ 乙醇
0.4mg/ml 戊巴比妥钠
√网织红细胞冲洗缓冲液Ⅰ，含和不含 1U/ml 肝素（稀释自 500U/ml 储存液）
√网织红细胞冲洗缓冲液Ⅱ
√焦碳酸二乙酯处理的水（DEPCW），灭菌
√100mmol/L $CaCl_2$
√1mmol/L 氯高铁血红素
√200U/ml 肌酸磷酸激酶
√15 000U/ml 金黄色葡萄球菌核酸酶 S7（新鲜配置）
√200mmol/L EGTA
√5 mg/ml 小牛肝 tRNA
√2mol/L KCl/10mmol/L $MgCl_2$（K/Mg）
√1mmol/L 无甲硫氨酸氨基酸
10mmol/L Ci/ml ^{35}S 甲硫氨酸（1000Ci/mmol），翻译级（如 NEN Life Sciences 或 Amersham）
20～40 U/μl 核糖核酸酶抑制剂（Promega）或相当品
√1mol/L 磷酸肌酸
翻译底物：从细胞或组织纯化的 mRNA，体外加帽或未加帽的 mRNA 转录物（见支持方案 1 和 2）
√5％（w/v）和 10％ 三氯乙酸（TCA）

60 ml 一次性注射器

1 ml 注射器

供 60 ml 注射器使用的 60 ml 弹簧

16 号和 1.5in 长的 20 号 Huberpoint 针（Fisher）

液氮

玻璃纤维滤膜（如 Whatman GFC 或相当品）

液体闪烁计数器和闪烁液

1. 5 天中，在每天下午的同一时间使用 20 号 Huberpoint 针向未成熟的新西兰雌性白兔（2～3kg）肩胛间皮下注射 2.5%盐酸苯肼，剂量为 0.25ml/kg。
2. 让兔子恢复 2 天，监测网织红细胞数。
3. 第 8 天早晨，使用 20 号 Huberpoint 针向兔子大腿肌肉注射 15～20mg/kg 的盐酸氯胺酮和 5mg/kg 的盐酸赛拉嗪。
4. 用 0.1ml 500U/ml 肝素包被 60ml 加载有弹簧的注射器的内侧，并加上 16 号针头。当兔子处于完全无意识状态时，将其腹部朝上固定，并向喉部喷洒 70%乙醇。将弹簧装于注射器，并将注射器中活塞完全推入，针头朝向心脏方向刺入到胸骨下。
5. 重新用 0.1ml 500U/ml 的肝素包被 60ml 的弹簧注射器内侧，用同一兔子重复取血过程，直到将血取尽。取血后，向腹膜内注射 200mg/kg 的戊巴比妥钠使其安乐死。
6. 将血注入到 5 倍体积的含有 1U/ml 肝素的网织红细胞冲洗缓冲液Ⅰ中。4℃，1400*g* 离心 10min，收集细胞。轻轻吸去上清液。
7. 将细胞重悬于 5～10 倍体积的无肝素网织红细胞冲洗缓冲液Ⅰ中，洗 2 次，每次在 4℃以 1400*g* 离心 10min，弃去上清。用网织红细胞冲洗缓冲液Ⅱ洗 1 次，离心。尽可能地吸去上清，以免将盐带入裂解液中。
8. 将细胞沉淀转移到刻度量筒中，记录细胞的体积。加入 1.5 倍体积的灭菌 DEPC 水。冰上搅拌 5min，充分裂解。4℃，20 000 *g* 离心 20min，除去细胞膜和线粒体。收集上清，分装并快速冻存作为“亲本裂解液”，用于与依赖 mRNA 的裂解液（MDL）进行比较。剩余的用限制性核酸内切酶处理。
9. 每 25 ml 的裂解液加入：

    250μl 100mmol/L $CaCl_2$

    500μl 1mmol/L 氯高铁血红素

    250μl 200U/ml 肌酸磷酸激酶

    250μl 15 000U/ml 核酸酶 S7

    20℃孵育 15min。
10. 加入 250μl 200mmol/L EGTA 以螯合钙离子并灭活核酸酶。加入 250μl 小牛肝 tRNA（5mg/ml）。以 500μl 分装冻存，保存于液氮中。
11. 使用适当的试验 RNA（从细胞、组织纯化，或通过体外转录获得的 mRNA），依 12～16 步骤操作，对每一批 MDL 的翻译活性进行检验。
12. 将保存的试剂取出置于冰上。手握使其迅速解冻并放在冰上。
13. 将下列反应组分加到 0.5～1.5ml 的无菌微量离心管中（50μl 反应体系）：

2.5μl K/Mg

2.5μl 无甲硫氨酸的氨基酸混合液

2.5μl 10mCi/ml^{35}S 甲硫氨酸

0.35μl 20～40U/μl 核糖核酸酶抑制剂

0.5μl 1mol/L 磷酸肌酸

0.5μl 200U/ml 肌酸磷酸激酶

0.5μl 1mmol/L 氯高铁血红素

35μl MDL

0.5～2μl（约0.5μg）mRNA 底物

加无核酸酶水至50μl终体积。

轻轻涡旋混合，必要时离心5s使反应混合物沉于管底。30℃孵育30min至1h。

14. 用1ml冰水稀释1～2.5 μl反应液，加入1ml 10%的TCA，测定掺入到TCA沉淀物中的放射量。将混合物于95℃加热10min以除去氨酰tRNA，然后于冰上冷却。

15. 真空过滤，收集玻璃纤维滤膜上的沉淀蛋白。用5% TCA冲洗，于红外灯下烘干滤膜。使用液体闪烁光度仪测量放射性。

16. 剩下的孵育物用于功能测定或SDS-PAGE分析（单元7.1）。

基本方案2　依赖mRNA的麦胚无细胞翻译体系的制备和使用

材料（带√项见附录1）

麦胚

√ 麦胚提取缓冲液（新鲜配制）

用提取缓冲液预平衡的100ml Sephadex G-25柱（Amersham Pharmacia Biotech）。

√ 100mmol/L $CaCl_2$

√1mmol/L 氯高铁血红素

√200U/ml 肌酸磷酸激酶

√15 000U/ml 核酸酶S7（新鲜配制）

√200mmol/L EGTA

√5mg/ml 小牛肝tRNA

50mmol/L ATP（见4NTP混合物配方）

50mmol/L GTP（见4NTP混合物配方）

50mmol/L 和1mol/L 乙酸镁

20～40U/μl 核糖核酸酶抑制剂（Promega）或相当品

√1mmol/L 无甲硫氨酸的氨基酸混合液

1mol/L 乙酸钾

√1mol/L 磷酸肌酸

10mCi/ml^{35}S 甲硫氨酸（1000Ci/mmol）

翻译底物：从细胞或组织纯化的mRNA，或体外加帽或未加帽的mRNA转录物

（见支持方案 1 和 2）

√焦碳酸二乙酯处理水（DEPCW）

√无 RNA 酶的灭菌玻璃粉

1. 设备及试剂需预冷，所有操作应在 4℃下进行。用 5g 灭菌的玻璃粉研磨 5g 麦胚，并加入 22.5ml 的麦胚提取缓冲液将其制成均匀的糊状。4℃，30 000 *g* 离心 10min。
2. 从上部取 20ml 上清，加到事先用提取缓冲液平衡的 100ml Sephadex G-25 柱子上。用约 100ml 相同缓冲液洗脱。
3. 当所有的提取物都流入柱子后，再加入 100ml 的提取缓冲液。按每次 2.5ml 接收流出组分，并用分光光度计测定 A_{260}。收集吸收值最高的组分（即透光最差的部分），通常是接收的第 20～30 个组分。
4. 将收集的组分冰上静置 5min，0℃ ，23 000 *g* 离心 10min。小心取上部的 20ml。
5. 每 20ml 裂解液加入：

    200μl 100 mmol/L $CaCl_2$

    400μl 1mmol/L 氯高铁血红素

    200μl 200U/ml 肌酸磷酸激酶

    200μl 15 000U/ml 核酸酶 S7

    于 20℃孵育 15min。
6. 每 20ml 液体加入 200μl 200mmol/L EGTA（螯合钙离子并灭活核酸酶）。
7. 每 20ml 裂解液加入：

    200μl 5mg/ml 小牛肝 tRNA

    625μl 50mmol/L ATP

    125μl 50mmol/L GTP

    37.5μl 1mol/L 乙酸镁

    混合，以 200～500μl 分装，快速冻存于液氮中。
8. 使用前检测每一批麦胚提取物的翻译活性（见基本方案 1，步骤 12）。
9. 将保存的试剂取出置于冰上。迅速用手温融化，放于冰上。
10. 将下列反应成分加到 0.5～1.5ml 的无菌微量离心管中（50μl）：

    25μl 麦胚提取物

    1μl 20～40U/μl 核糖核酸酶抑制剂

    4μl 无甲硫氨酸（或其他合适的氨基酸）氨基酸混合液

    3.75μl 1mol/L 乙酸钾

    1μl 50mmol/L 乙酸镁

    2.5μl 10mCi/ml ^{35}S 甲硫氨酸（1000Ci/mmol）

    0.5～2μl mRNA 底物（0.5～1μg）

    加入 DEPCW 至 50μl

    轻轻涡旋混合，必要时，离心 5s 使反应混合物沉于管底。25℃孵育 1～2h。
11. 取 1.0～2.5μl 反应混合液测定掺入 TCA 沉淀物中的放射性（见基本方案 1，步骤 14 和 15）。剩余部分用于功能测定或 SDS-PAGE 分析（单元 7.1）。

基本方案 3　利用协同转录/翻译体系进行体外蛋白质合成

由噬菌体 RNA 聚合酶完成的 cDNA 克隆的转录可与翻译在同一反应体系中同时进行，即通过将 DNA 直接加入到含有合适的 RNA 聚合酶（T3、T7 或 SP6）的翻译体系中来实现。

材料（带√项见附录 1）

√2mol/L KCl/10mmol/L $MgCl_2$（K/Mg）
√无甲硫氨酸的氨基酸混合液
√25×转录/翻译缓冲液（TX/TL 缓冲液）
10mCi/ml ^{35}S 甲硫氨酸（1000Ci/mmol）
20～40U/μl RNA 核糖核酸酶抑制剂（Promega）或相当品
√1mol/L 磷酸肌酸
√200U/ml 肌酸磷酸激酶
√1mmol/L 氯高铁血红素
依赖 mRNA 的裂解液（MDL；见基本方案 1 或 2）
质粒 DNA，≥0.1mg/ml
合适的噬菌体 RNA 聚合酶（如 T3、T7 或 SP6）
√焦碳酸二乙酯处理的水（DEPCW）

1. 将保存的试剂取出置于冰上。迅速用手温解冻，放于冰上。
2. 将下列反应成分加于 0.5～1.5ml 的无菌微量离心管中（50μl）：
   2.5μl K/Mg
   2.5μl 无甲硫氨酸的氨基酸混合液
   2.0μl 25×TX/TL 缓冲液
   2.5μl 10mCi/ml（1000Ci/mmol）^{35}S 甲硫氨酸
   0.35μl 20～40U/μl 核糖核酸酶抑制剂
   0.5μl 1mol/L 磷酸肌酸
   0.5μl 200U/ml 肌酸磷酸激酶
   1μl 1mmol/L 氯高铁血红素
   25μl MDL
   0.5～2μl 质粒 DNA（约 0.5μg）
   RNA 聚合酶 600～1000U/ml
   DEPC 水至 50μl。

   轻轻涡旋混合，必要时，离心 5s 使反应混合物沉于管底。30℃孵育 1h。
3. 依非协同体系方法分析（见基本方案 1，步骤 14～16）。

   使用含有 EMCV 5′UTR 和 3′多聚 A 序列的结构会得到最好的结果。

支持方案1　无帽体外转录物的制备

体外产生的转录物可用来代替由网织红细胞或麦胚翻译体系中纯化的 mRNA。对于未加帽的转录物的翻译而言，可以通过将目的 cDNA 插入到载体中来提高翻译的效率，该载体起始密码的上游含有内部核糖体进入位点（IRES），可产生通过帽子非依赖性翻译过程被加工的 mRNA。

材料（带√项见附录1）

√焦碳酸二乙酯处理的水（DEPCW），灭菌
√5×改良转录缓冲液（MTB）
√12.5mmol/L 4NTP 混合液
√1mol/L $MgCl_2$
√250mmol/L DTT
三羟甲基甘氨酸配制的［α-^{32}P］CTP（3000Ci/mmol），用 DEPCW 稀释到 10 000～50 000cpm/μl
20～40U/μl 核糖核酸酶抑制剂（Promega）或相当品
含有合适的噬菌体聚合酶启动子的质粒 DNA 或 PCR 产物，线性化，浓度为 0.2～0.5mg/ml，使用限制性内切酶使其产生 5′黏端
20U/μl RNA 聚合酶（SP6、T3 或 T7；Promega）
0.5mg/ml 酵母 tRNA（作为 TCA 沉淀的载体）
√5%（w/v）三氯乙酸（TCA）
√ 0.5mol/L EDTA
无 RNA 酶的 RQ1 DNA 酶（Promega）
√TE 缓冲液，pH8.0
1∶1（v/v）TE-饱和酚/氯仿
24∶1（v/v）氯仿/异戊醇
7.5mol/L 乙酸铵
100% 和 70% 乙醇
干冰/乙醇浴
玻璃纤维滤膜（如 Whatman GFC 或相当品）
液体闪烁计数器

1. 将保存的试剂取出置于冰上。
2. 在室温下，依次将下列反应物放入灭菌的 1.5ml 螺旋帽微量离心管中（共 50μl）：

14.7μl DEPCW
10μl 5×MTB
16μl 12.5mmol/L 4NTP 混合液
0.8μl 1mol/L $MgCl_2$

2μl 250mmol/L DTT

2.5μl 20～40U/μl 核糖核酸酶抑制剂

1μl 10 000～50 000cpm/μl [α-^{32}P] CTP（终浓度 200～1000cpm/μl）

1μl 0.2～0.5mg/ml 线性 DNA

2μl 20U/μl 合适的 RNA 聚合酶（终浓度 800U/ml）

轻轻涡旋混合，离心 5s 使反应混合物沉于管底。

应谨慎选择使 DNA 线性化的限制性酶。因为含有 3′黏端的模板能从这些酶切位点处进行 RNA 转录。像能产生 5′黏端的 *Bam*H Ⅰ 和 *Nco* Ⅰ 都是很好的选择，但是像 *Apa* Ⅰ、*Sac* Ⅰ 和 *Pst* Ⅰ 能产生 3′黏端的酶应当避免使用。

3. 分别向两个玻璃纤维滤膜上滴加 1μl 的混合液，并使滤膜干燥；同时，将剩余的反应混合液于 37℃孵育 30min 到 1h。
4. 孵育结束后，吸取两份 1μl 的转录混合物样品，在冰上加到 100μl 0.5mg/ml 的酵母载体 tRNA 中，再加入 2ml 的 5%TCA，真空过滤收集玻璃纤维滤膜上的沉淀并干燥。
5. 用液体闪烁光度仪测定滤膜上孵育前和孵育后样品的总放射性（cpm/μl）。

   用第二个样品的值除以第一个样品的值可得到掺入转录物中 [α-^{32}P] CTP 的百分率。25%～30% [α-^{32}P] CTP 的掺入表明有 50～60nmol CTP 的存在和约 200～240nmol RNA 的产生。
6. 加入 EDTA 至终浓度 10mmol/L（取自 0.5mol/L 储存液），以螯合游离 Mg^{2+}，可于－20℃保存数月。
7. 选择步骤（步骤 7 和 8）：每微克模板 DNA 加入 1U RQ1 DNA 酶，37℃孵育 15min。在反应混合液中加入 200μl TE 缓冲液，然后用 250μl 1∶1（v/v）的 TE 饱和的酚/氯仿抽提，涡旋 1min，4℃以最大速度微量离心 5min。将上部液相转移到另一个新的管中，再用 250μl 24∶1 的氯仿/异戊醇抽提。
8. 向最终的液相中加入 0.5 倍体积的 7.5mol/L 的乙酸铵和 2.5 倍体积的 100%乙醇。将混合液放于干冰/乙醇浴中 10min。4℃以最大速度微量离心 5min。吸去上清，用 1ml 70%乙醇洗涤沉淀。真空干燥，将沉淀重悬于 1 倍体积的 DEPCW 中，得到终浓度为 1mg/ml 的转录物。－85℃保存。

   通过加入添加物阻止 PKR 的活化或 eIF 的磷酸化，可以得到更高水平的翻译产物，添加物包括 2～10mmol/L 的 2-氨基嘌呤、高浓度（10μg/ml）的 dsRNA，如多聚(I)·多聚（C）或 100～200pmol/ml 的牛痘病毒 *K3L* 基因产物，eIF2α 的假底物。

支持方案 2　带帽体外转录物的制备

带帽转录物的制备较无帽转录物更加昂贵，更富有挑战性，对于许多 RNA 的翻译来讲可能并不是必需的。

附加材料（同见支持方案 1，带√项见附录 1）

√5×转录缓冲液（TB）

ATP、CTP、UTP和GTP各10mmol/L（见4NTP混合液配方）

10mmol/L ^{7}m（5′）Gppp（5′）G（帽类似物，AMERsham，Pharmacia Biotech）

1. 将保存的试剂取出置于冰上。
2. 在室温下，依次将下列反应物放入灭菌的1.5ml螺旋帽微量离心管中（共50μl）：
   13.375μl DEPCW
   10μl 5×TB
   10mmol/L ATP、CTP、UTP和GTP各5μl
   0.625μl 10mmol/L GTP
   2.5μl 10mmol/L^{7}m（5′）Gppp（5′）G
   1μl 10 000～50 000cpm/μl［α-^{32}P］CTP（终浓度200～1000cpm/μl）
   2μl 250mmol/L DTT
   2.5μl 20～40U/μl 核糖核酸酶抑制剂
   1μl 0.2～0.5 mg/ml 线性质粒DNA
   1μl 20U/μl 合适的RNA聚合酶（终浓度400U/ml）

   轻轻涡旋混合，离心5s使反应混合物沉于管底。
3. 分别向两个Whatman GCF滤膜上滴加1μl的混合液，并使滤膜干燥；同时，将反应混合液于37℃孵育45min。
4. 孵育45min后，进行两份相同的反应，吸取1μl反应混合液样品，在冰上加到100μl 0.5mg/ml的酵母载体tRNA中，再加入2ml的5%TCA，真空过滤。收集玻璃纤维滤膜上的沉淀并干燥。
5. 用液体闪烁光谱法测定滤膜上孵育前和孵育后样品的总放射性（cpm/μl）。

   用第二个样品的值除以第一个样品的值可得到掺入转录物中［α-^{32}P］CTP的百分率。
6. 另加入0.625 μl 10mmol/L GTP和1μl 20U/μl RNA聚合酶。继续孵育45min，然后用步骤5的方法测定掺入［α-^{32}P］CTP的百分率。

   这些条件可使18%～22%的CTP被掺入，相当于9～11nmolCTP、36～44nmolRNA和12～15μg RNA. 这些转录物中有75%～90%被加帽。
7. 用RQ1 DNA酶终止反应，并用苯酚提取、乙醇沉淀的方法纯化。（见支持方案1，步骤7和8）。

备择方案　用生物素连接的氨基酸进行体外翻译

生物素连接的赖氨酸残基可用于检测无细胞翻译体系合成的蛋白质。无需使用^{35}S甲硫氨酸或其他具有放射性的氨基酸。

附加材料（同见基本方案1和2，带√项见附录1）

依赖mRNA的裂解液（见基本方案1，步骤11；或基本方案2，步骤8）

0.5 μg/μl（12pmol/μl）生物素连接的赖氨酸-tRNA复合物（Promega的transcend

tRNA，或 Boehringer Mannheim 的生物素-赖氨酸-tRNA 试剂盒）

√完全氨基酸混合物

链霉亲和素-碱性磷酸酶（链霉亲和素-AP）或链霉亲和素-辣根过氧化物酶（链霉亲和素-HRP）

链霉亲和素磁珠（Dynal）或链霉亲和素样的捕获树脂

MagneSphere Paramagnetic Particles 磁珠或 Softlink 温和释放的抗生物素蛋白树脂 Soft Release Avidin Resin（Promega）

M-280 链霉亲和素磁珠（Dynal）或链霉亲和素磁性颗粒，链霉亲和素，固定化的（凝胶悬液；Boehringe Mannheim），可选择

1. 将保存的反应试剂取出置于冰上。用手温将 MDL 快速解冻并置于冰上。
2. 加入各种成分配制成 50μl 的翻译反应体系（见基本方案 1，步骤 13；或基本方案 2，步骤 10），用 2μl 0.5μg/ml 的生物素连接的赖氨酸 tRNA（1μg；24pmol）替代 ^{35}S 甲硫氨酸，用完全氨基酸混合物替代无甲硫氨酸的氨基酸混合物。适当调整终体积，反应混合物 30℃孵育 1h。

   在用于分析前翻译反应混合液可在－20～－85℃保存数月。
3. SDS-PAGE 电泳分析反应混合物（单元 7.1）并转移到 PVDF 膜上（单元 7.7）。
4. 应用化学发光或显色法（单元 7.7）通过链霉亲和素-AP 或链霉亲和素-HRP 检测翻译产物。

支持方案 3　用链霉亲和素-琼脂糖捕获生物素连接的蛋白质

材料（带√项见附录 1）

翻译反应混合物（见备择方案，步骤 2）

Softlinke 温和释放的抗生物素蛋白树脂（Promega），40℃ 用 5 倍体积 TBS 洗涤

√TBS

√2×SDS-PAGE 上样缓冲液

1. 取翻译反应混合物 10μl，加到 20μl TBS 中，30℃孵育 5～10min。
2. 取 TBS 洗过的生物素树脂 40μl，加到反应混合液中，4℃ 孵育 1h，定时搅拌。
3. 短暂离心或静置使树脂沉降。
4. 将沉淀用 TBS 洗 3～5 次。
5. 加 20～50μl 2×SDS-PAGE 上样缓冲液，使结合的蛋白质从树脂上洗脱下来。95℃加热 5min，使生物素连接的蛋白质从微珠上释放。分析获得的蛋白质。

参考文献：Beckler et al. 1995；Jagus，1987；Morch et al.，1986

撰稿人：Rosemary Jagus，Bhavesh Joshi，Suzanne Miyamoto，and Gregory S. Beckler

单元 12.2　蛋白质共翻译转运进入犬粗面微粒体

注意：所有使用活体动物的方案必须首先通过动物保护和使用委员会（IACUC）的审查和批准，或者必须遵守政府有关实验室动物保护和使用的规定。

基本方案　向犬粗面微粒体的转运

材料（带√项见附录 1）

麦胚或网织红细胞翻译混合液（单元 12.1）
1 eq/μl RM 溶液（见支持方案 1）
编码目的蛋白的 mRNA
编码胞液对照蛋白的 mRNA
√缓冲液 C
30%（w/v）三氯乙酸（TCA；4℃保存），冰冷
可选择步骤：
20mg/ml 蛋白酶 K（－20℃保存）
非离子去垢剂：如 20% Triton X-100 或 NP-40（－20℃保存）
25%（w/v）十二烷基硫酸钠（SDS；室温保存）
√1mmol/L 二硫苏糖醇（DTT）
√缓冲液 D
内切糖苷酶 H（固体或储存液形式）
100mmol/L 碳酸钠，pH11.5，冰冷
冰乙酸
√1×SDS 样品缓冲液
水浴或加热器，26℃，或 30℃和 100℃（可选择步骤）。
台式超速离心机和转头（如 Beckman TLA 100.2 转头；可选择步骤）

1. 确定要进行的实验中所需的体外翻译反应液的数量和总体积（单元 12.1）。将所有反应试剂置于冰上，制备所有反应中都需要的主翻译混合液（如麦胚提取物、放射性氨基酸）。吸取适量的主混合液，加到包括反应对照管在内的每个反应管中。
2. 以每 10μl 翻译混合液加入 0.1～1eq RM（0.1～1μl 溶液）的比例将 RM 加到每个反应管中；在无 RM 的对照管中，加等体积的缓冲液 C，然后加适量的 mRNA（无 RNA 的对照管中加缓冲液 C）。将麦胚反应管置于 26℃孵育 40～60min，或鼠网织红细胞翻译管于 30℃孵育 40～60min。

   一般来说，在 10μl 翻译混合物中有 10～50ng 进行有效翻译的 mRNA 即可得到满意的信号，但也可以加更多的量。
3. 将反应管置于冰上终止反应。
4. 如果要进行样品的翻译后处理（如蛋白酶消化），则继续步骤 5，6 和（或）7。否

则，向反应管中加1倍体积的30%三氯乙酸，冰上孵育10min，使蛋白质沉淀；然后继续步骤8。

5. 为了证明蛋白质或蛋白质的结构域已经转运进入RM腔（可选择步骤），进行如下步骤：
   a. 加蛋白酶K至终浓度为100μg/ml。将反应液分成2等份，一份加入0.5%～1%的非离子去垢剂，另一份不加，0℃孵育30～60min。
   b. 加PMSF使终浓度为2mmol/L，终止蛋白质消化，0℃再孵育15min。
   c. 用30% TCA沉淀蛋白质（见步骤4）。

   多余的去垢剂会使RM裂解，并使转运蛋白暴露而被蛋白酶消化。
6. 为了从转运蛋白中去除N连接糖链（可选择步骤），进行如下步骤：
   a. 加入终浓度为2%的SDS和75mmol/L的DTT，煮沸样品3min。
   b. 用缓冲液D将样品稀释20倍，加入内切糖苷酶H，使终浓度为1μg/ml。37℃孵育12～16h。
   c. 用30% TCA沉淀蛋白质（见步骤4）。
7. 为了检测膜整合（作用）（可选择步骤），进行如下步骤：
   a. 用预冷的100mmol/L Na_2CO_3 pH 11.5将翻译反应液稀释100倍，冰上孵育30min。
   b. 4℃ 36 000g_{av}离心30min。
   c. 小心取上清并用冰乙酸中和，用30% TCA沉淀蛋白质（见步骤4）。
   d. 同时，直接用1×SDS上样缓冲液溶解内含核糖体和膜碎片的沉淀（这一步可以在SDS-PAGE凝胶上进行，无需进一步操作）。
8. 4℃全速微量离心5min，使沉淀的蛋白质沉降，小心弃去上清。加入1×SDS上样缓冲液煮沸3～5min或煮沸至沉淀溶解。

   如果没有将TCA去除干净，样品可能呈酸性（样品缓冲液中的溴酚蓝会变成黄色）可以加少量的1mol/L Tris来补救。
9. 用SDS-PAGE电泳分析蛋白质的转运和修饰（见单元7.1）

支持方案1　从犬胰腺制备RM

注意：本方案中所有步骤（解剖和离心除外）都应在4℃冷室中进行。因为在解剖胰腺后尽快将组织冷却是非常重要的，因此所有的溶液都应预冷，所有的装置和玻璃器皿都应提前置于冷室中。

材料（带√项见附录1）

√缓冲液A，冰冷
狗（如重10～12kg的小猎兔犬）
√缓冲液B，冰冷
√缓冲液C，冰冷
√1%（w/v）SDS，冰冷
液氮
解剖工具：小剪刀，常规镊子和尖头镊子，解剖刀（新刀刃）

小塑料切板，单面剃须刀片（至少5个）

带60ml圆柱形聚四氟乙烯活塞的Potter-Elvejhem型组织匀浆机（如B. Braun Biotech）

50ml聚碳酸酯或聚丙烯离心管（直径约28.5mm）

中速离心机和转头（Sorvall SS-34或Beckman JA 20，或相当设备）

25mm×89mm（26ml）聚碳酸酯带盖超速离心瓶

装有圆形移液针头的10ml玻璃注射器

超速离心机和转头（Beckman Ti50.2或相当设备）

带A型研杵的60ml Dounce组织匀浆机

1. 用有吸收性能的塑料工作台罩覆盖工作面。将100ml冰上预冷的缓冲液A（足够覆盖组织）加至250ml玻璃烧杯中，并使其全部浸入冰中，直到完全冷却。
2. 将狗处死，在其腹部做一切口，探查腹腔分离胰腺。尽快分割下胰腺并立即放入装有预冷的缓冲液A的烧杯中。
3. 用新鲜预冷的缓冲液A清洗胰腺，除去血液和其他碎片。将胰腺放在一块石蜡封口膜上，用剪刀和尖镊子除去主要血管、脂肪和结缔组织。

   仔细清理胰腺是重要的，因为多余的组织会干扰匀浆的有效进行。但尽快处理以减少胰腺的坏死也很重要。
4. 将保持在冰烧杯中的胰腺称重，用新的剃须刀切碎组织。当刀刃变钝时，要经常更换刀片。

   一只10～12kg重量的狗，其胰腺重量一般为20～30g。
5. 将组织块放在干净的烧杯中，加入相当于胰腺重量4倍的冰冷的缓冲液A。搅动组织块和缓冲液，使其混匀。每份取混合液60ml，用电动Potter-Elvejhem式匀浆机进行组织匀浆（上下充分抽取5次），溶液和匀浆机都应保持低温。
6. 将匀浆液倒入干净的烧杯中，充分混合后转移到50ml离心管中，4℃，$700g_{av}$离心10min。
7. 小心吸去每个离心管顶部的脂肪层，然后将上清倒入一个干净的烧杯中，充分混合所有的上清液并转移到50ml干净的离心管中，4℃ $8000g_{av}$离心10min。
8. 小心将“线粒体后”的上清倒入一个干净的烧杯中，从上清液（细胞提取液）中吸出16ml加到25mm×89mm（26ml）聚碳酸酯超速离心管中。
9. 用10ml装有圆形移液针头的玻璃注射器抽取8ml预冷的缓冲液并将其注入到细胞提取物的下面，扣紧瓶盖，4℃ $145\ 000\times g_{av}$离心2.5h。
10. 小心吸取上层液体并弃去，然后吸取界面上的雾样条带，该层富含高尔基体。最后吸去缓冲液B垫层。在每管中分别加几毫升预冷的缓冲液C，用橡皮刮收棒重悬沉淀的RM。将重悬物转移到60ml Dounce匀浆机中。用几毫升缓冲液C冲洗离心管，收集残留的RM。
11. 通过5次上下抽取来分散匀浆机中的RM，将RM转移到一个干净的100ml刻度量筒中。取两个10μl的RM分别加到1ml预冷的1%SDS中。由于取样时会有相当一部分液体黏附在吸头的外壁，所以在将RM加入到1%SDS中以前要将吸头擦净。

在加入时要来回吸取几次，以保证吸头中的 RM 全部转移到溶液中。

12. 测定每个样品在 280nm 的吸收值。取两次测定的平均值，调整微粒体的浓度为 $50A_{280}$ U/ml（相当于 1 eq* /μl RM）。
13. 将 RM 适量分装，液氮中冻存。

支持方案 2　制备 EDTA 剥离的粗面微粒体

注意：本方案中所有步骤都应在 4℃冷室中进行。所有溶液都应预冷，所有的装置和玻璃器皿都应预先置于冷室中。

附加材料（见支持方案 1）

RM 粗提组分（见支持方案 1）
缓冲液 C（见配方）/50mmol/L EDTA，冰冷
缓冲液 C（见配方）/0.5mol/L 蔗糖，冰冷

1. 向 RM 粗提物中加入 1 倍体积的缓冲液 C/50mmol/L EDTA，0℃孵育 15min。
2. 取约为 RM 混合液体积一半的蔗糖溶液（内含缓冲液 C/0.5mol/L 蔗糖）作为垫层加到超速离心管中，用吸管小心将 RM 加在蔗糖垫层的上面，注意将吸管贴住管壁加液，以免破坏蔗糖垫层，4℃ 145 000×g 离心 1h。
3. 将沉淀的膜成分重悬于原体积一半的缓冲液 C（不含 EDTA 或蔗糖）中。用 Dounce 匀浆机分散膜性囊泡（见支持方案 1，步骤 11），然后转移到一个刻度量筒中。
4. 用缓冲液 C 调整溶液至原体积，得到的 RM 可供使用或储存。

支持方案 3　柱洗脱粗面微粒体的制备

注意：本方案中所有步骤都应在 4℃冷室中进行。所有溶液都应预冷，所有的装置和玻璃器皿都应预先置于冷室中。

附加材料（同见支持方案 1；带√项见附录 1）

Sepharose CL-2B 树脂（Pharmacia Biotech）
√缓冲液 E，冰冷
RM 粗提物（见支持方案 1）
Sepharose CL-2B 层析柱
超速离心机和转头（Beckman 45 Ti 转头或相当设备）

1. 准备一个 Sepharose CL-2B 层析柱，其体积为要处理的 RM 体积的 10 倍。用几个柱体积的缓冲液 E 平衡柱子。
2. 将 RM 加在 Sepharose CL-2B 柱上，收集一个空体积的流出液。

* eq：equivalent 的缩写，当量之意

3. 将混浊的组分合并，4℃ 85 000×g_{av}离心 30min。将沉降的膜成分重悬于原体积一半的缓冲液 C 中。
4. 用 Dounce 匀浆机分散膜性囊泡（见支持方案 1，步骤 11），然后转移到一个刻度量筒中。
5. 用缓冲液 C 调整溶液至原体积，得到的 RM 可供使用或储存。

参考文献：Blobel and Dobberstein，1975

撰稿人：Harris D. Bernstein

单元 12.3 体外分析哺乳动物细胞中内质网到高尔基体的物质运输

本实验基于这样一种事实，即由水疱性口炎病毒的温度敏感型突变体编码的糖蛋白（VSV-G ts045）从内质网到高尔基体的运输过程可以被追踪。当在限定的温度（39.5℃）下，VSV-G ts045 留存于内质网中；而当温度降至允许温度 32℃时，该蛋白质即从内质网输出。

警告：当使用放射性物质时，应采取适当的措施防止实验人员和环境受到污染。应遵照当地放射性安全官员的有关指导，在指定的范围内进行实验和处理废弃物。

注意：用于细胞培养的所有溶液和装置必须是无菌的，同时要根据情况使用适合的无菌技术。除非有特殊要求，所有的培养均应在潮湿的、37℃、5%CO_2 条件的培养箱中进行。一些培养基（如 DMEM）还需要通过改变 CO_2 浓度来维持 pH 为 7.4。

注意：VSV 病毒及样品被处置前应用漂白剂处理。

基本方案 1 用半完整细胞重建内质网到高尔基体的运输

材料（带√项见附录 1）

正常大鼠肾细胞（NRK）
√α-MEM 培养基，无血清或含 5%FBS
VSV ts045 病毒株（滴度约 2×10^9 pfu* /ml，见支持方案 2）
1mg/ml 放线菌素 D，乙醇配制
√无甲硫氨酸标记培养基
^{35}S 甲硫氨酸（约 11mCi/ml，1175Ci/mmol；反式^{35}S-标记，ICN Biomedicals）
20mmol/L 未标记的甲硫氨酸（组织培养级；Sigma）
√穿孔缓冲液，冰冷
√溶胀缓冲液，冰冷
1%（w/v）台盼蓝
大鼠肝脏细胞液（见支持方案 3）
1mol/L HEPES 酸，pH7.4

* pfu：plaque-forming unit 的缩写，即噬蚀斑形成单位

0.1mol/L 乙酸镁

1mol/L 乙酸钾

√10×Ca^{2+} 缓冲液

√20×ATP 再生体系

40mmol/L UDP-N 乙酰葡萄糖胺

√Endo H 缓冲液

75mU/ml 内切糖苷酶 H（Endo H；Boehringer Mannheim），溶于 0.1mol/L 乙酸钠，pH5.6

√4×SDS 上样缓冲液

荧光显影增强液：125mmol/L 水杨酸（钠盐），pH7.0，溶于 30%（w/v）甲醇

32℃培养箱

32℃、37℃和 39.5℃水浴

1. 将 NRK 细胞培养于 10mm 的组织培养皿中，使其长成单层。
2. 制备组成为 0.9ml 无血清 α-MEM、0.1ml VSV ts045 病毒（终浓度约 2×10^8 pfu/ml）和 5ul 1mg/ml 放线菌素 D（终浓度 5μg/ml）的感染混合液（一个平皿量）。向每个平皿中加入 1ml 感染混合液，32℃培养箱中持续摇动 45min（或每隔 5min 用手摇动），确保感染混合液分散均匀。
3. 向每个平皿中加入 5ml 含 5%FBS 的 α-MEM，32℃孵育 3h 又 40min。
4. 将细胞置于 39.5℃水浴中，用 3ml 无甲硫氨酸标记培养液漂洗 3 次，然后加 3ml 相同培养液，在 39.5℃孵育细胞 15min。
5. 去除标记培养液，加入 1.5ml 添加了 100μCi ^{35}S 甲硫氨酸的无甲硫氨酸标记培养液，39.5℃孵育 10min，不时振荡。加 30μl 的 20mmol/L 未标记甲硫氨酸，39.5℃孵育 2min。
6. 将细胞转移到冰上，用 5ml 预冷的穿孔缓冲液冲洗 3 次。用 5ml 预冷的溶胀缓冲液覆盖细胞，将细胞置于冰上 10min。
7. 吸去溶胀缓冲液，加 3ml 预冷的穿孔缓冲液，并立即用橡皮细胞刮刮取细胞，将细胞转移到一个 15ml 聚碳酸酯管中，4℃ 800*g* 离心 3min，沉降细胞。
8. 用 3ml 预冷的穿孔缓冲液漂洗沉降的细胞，再次离心。用 200～300μl 预冷的穿孔缓冲液重悬细胞。
9. 取 10μl SIC，加入 1μl 1%的台盼蓝，混匀后滴在盖片上。用光学显微镜观察并测定细胞穿孔的程度。SIC 应立即使用。
10. 如表 12.3.1 所示配制反应混合液，并加到微量离心管中。同时设置两个相同的反应和两个阴性对照：完全反应混合液在冰上孵育，不含细胞液的反应混合液在 32℃孵育。
11. 轻轻涡旋 3s，32℃水浴孵育 90min。
12. 4℃ 16 000*g* 微量离心 20s 沉降 SIC。将沉淀的 SIC 重悬于 20μl Endo H 缓冲液中。煮沸 5min，短暂离心，冷却。加 40μl 用 0.1mol/L 乙酸钠配制的 pH5.6 浓度为 75mU/ml 的 Endo H（3mU），37℃水浴孵育过夜。

13. 加 20μl 4×SDS 样品缓冲液终止反应。在 6.75%（w/v）聚丙烯酰胺大凝胶上分离 Endo H 敏感性和抗性 VSV-G（见单元 7.1）。
14. 室温下用荧光显影增强液处理凝胶 20min，制备干胶，并在－80℃下进行放射自显影（单元 7.8）。
15. 用密度测定法定量测定不同型的 VSV-G 的强度（单元 7.8）。

内质网到高尔基体运输实验中的疑难解答见表 12.3.2。

表 12.3.1　半完整细胞中内质网到高尔基体转运实验的反应混合物组成

溶　液	加入体积/μl	终浓度
SIC[a]	5	
鼠肝脏细胞液	5	3mg/ml
1mol/L HEPES 酸，pH7.4	1	25mmol/L
0.1mol/L 乙酸镁	1	2.5mmol/L
1mol/L 乙酸钾	2	50mmol/L
10×Ca^{2+} 缓冲液	4	1×
20×ATP 再生体系	2	1×
40mmol/LUDP-N 乙酰葡萄糖胺	0.5	0.5mmol/L
水	至 40ul（总体积）	

a. SIC，半完整细胞。

表 12.3.2　内质网到高尔基体转运实验的疑难解答

问　题	可能的原因	解决方法
在 SIC 检测中，在无细胞液的对照样品中出现高百分比的转运	穿孔细胞较少 细胞液没有充分从细胞中洗出	测定穿孔的百分比；对特定的细胞系进行方案优化 穿孔后在冰上孵育细胞 10min[a]
在内质网囊泡的制备中不能将膜成分完全重悬[b]	重悬缓冲液的浓度和/或 pH 不正确 重悬之前加入的盐	用折射仪检测蔗糖的浓度；检测 pH 使用无盐重悬缓冲液 只在完全重悬后加盐
在 SIC 检测中无运输发生；在微粒体检测中无出芽发生	反应中的钠离子	用 KOH 调整所有溶液的 pH；用 125mmol/L 乙酸钾，25mmol/L HEPES，pH7.2 透析添加成分
在第二阶段的融合反应未发生融合	反应中的钠离子和（或）蔗糖	确保实验中使用的是蔗糖而不是山梨醇

a. 见基本方案 1。

b. 见基本方案 3。

备择方案 用半完整细胞重建内质网到高尔基体顺面区域的运输

有时需要将内质网到高尔基体顺面结构的转运与内质网到高尔基体顺面区域/高尔基体中间区域的运输分别研究。

附加材料（同见基本方案 1；带√项见附录 1）

克隆 15B 中国仓鼠卵巢细胞（CHO）（ATCC）

√Endo D 缓冲液

0.5mU/μl 内切糖苷酶 D（Endo D；Boehringer Mannheim）

1. 将克隆的 15B CHO 细胞培养于 100mm 的组织培养皿中，使其长成单层。同时制备感染性 VSV，^{35}S 标记的 SIC（见基本方案 1，步骤 2～9）。
2. 除了不加 UDP-N 乙酰葡萄糖胺外，按照表 12.3.1 所示配制反应混合液并加到微量离心管中。设置两个相同的反应和两个阴性对照：完全反应混合液在冰上孵育，不含细胞液的反应混合液在 32℃ 孵育。轻轻涡旋 3s 后在 32℃水浴中孵育 90min。
3. 4℃，15 000g，超速离心 20s 沉降 SIC。将沉降的 SIC 重悬于 60μl 含有 0.5mU Endo D 的 Endo D 缓冲液中，37℃水浴孵育过夜。
4. 分析结果（见基本方案 1，步骤 11～15）。

基本方案 2 用哺乳动物细胞微粒体体外重建内质网到高尔基体的运输

材料（带√项见附录 1）

微粒体（见支持方案 1）

鼠肝细胞质（见支持方案 3）

1mol/L HEPES 酸，pH 7.4

0.1mol/L 乙酸镁

1mol/L 乙酸钾

√10×Ca^{2+}缓冲液

√20×ATP 再生体系

2.5mol/L 山梨醇

40mmol/L UDP-N 乙酰葡萄糖胺

√Endo H 缓冲液

75mU/ml 内切糖苷酶 H（Endo H；Boehringer Mannheim），溶于 0.1mol/L 乙酸钠 pH5.6

√4×SDS 样品缓冲液

抗 VSV-G 的单克隆抗体 p5D4（Kreis，1986）

辣根过氧化物酶（HRP）偶联的二抗

32℃和 37℃水浴

1. 如表 12.3.3 所示配制反应混合液并轻轻涡旋。进行两组相同的反应，另设置一个额外的完全反应液，冰上孵育，作为阴性对照。

   本试验中乙酸钾的终浓度应控制在 70～80mmol/L，其中约 45mmol/L 来自于微粒体和细胞液。实验中如果加入其他组分，则需要改变乙酸钾的加入量，以使其终浓度保持在 70～80mmol/L。

2. 将反应管移入 32℃水浴中孵育 60～90min。
3. 将反应管置冰上终止反应。4℃，20 000g，离心 10min 收集膜成分，吸去上清。

表 12.3.3 体外内质网到高尔基体转运实验及内质网囊泡体外形成实验的反应混合液组成

溶　液	加入体积/μl	终浓度
微粒体	7.5	0.5～1mg/ml
鼠肝细胞细胞液	7.5	4.5mg/ml
1mol/L HEPES 酸，pH7.4	1	25mmol/L
0.1mol/L 乙酸镁	1	2.5mmol/L
1mol/L 乙酸钾	1.4	35mmol/L
10×Ca^{2+}缓冲液	4	1×
20×ATP 再生体系	2	1×
2.5mol/L 山梨醇	3	187.5mmol/L
40mmol/L UDP-N 乙酰葡萄糖胺	1	1mmol/L
水	至 40μl	

4. 将沉淀重悬于 20μl Endo H 缓冲液，煮沸 5min，短暂离心，冷却。加由 pH5.6 0.1mol/L 乙酸钠配制的 40μl 75mU/ml Endo H（3mU），37℃水浴孵育过夜。
5. 加 20μl 4×SDS 样品缓冲液终止反应，在 6.75%（w/v）大聚丙烯酰胺凝胶上分离 Endo H 敏感性和抗性 VSV-G（单元 7.1）。
6. 用 Tris/甘氨酸/甲醇转移缓冲液，在 40V 电压下转移 6.5～10h，将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上，取抗 VSV-G 单克隆抗体 p5D4 和辣根过氧化物酶偶联二抗，用 BLOTTO 1∶10 000稀释行免疫印迹（单元 7.7）。用密度测定法定量测定不同形式 VSV-G 的强度。

   本方案中只能检测到 G_{H0} 和 G_{H1} 两种类型。

基本方案 3　内质网膜泡的体外形成和分离

材料（带√项见附录 1）

微粒体（见支持方案 1）

大鼠肝细胞细胞液（见支持方案 3）

1mol/L HEPES 酸，pH7.4

0.1mol/L 乙酸镁

1mol/L 乙酸钾

√10×Ca^{2+} 缓冲液

√20×ATP 再生体系

2.5mol/L 山梨醇

√重悬缓冲液，冰冷

√1×SDS 样品缓冲液

抗 VSV-G 单克隆抗体 p5D4（Kreis 1986）

辣根过氧化物酶（HRP）偶联二抗

p5D4-Dynabeads：p5D4 偶联的 M-500 Dynabeads（Dynal；见厂家说明书）

√免疫沉淀缓冲液

√FBS

100mmol/L EDTA（用 KOH 调节 pH8.0）

√转运缓冲液

32℃ 水浴

磁性微量离心管套管

1. 除了不加 UDP-N-乙酰葡萄糖胺以外，按照表 12.3.3 所示，在需要的时间点建立 40～100μl的反应体系，将一个完全反应体系置于冰上作为阴性对照。

   为了测定出芽的速率，在 0～60min 的时间内，每 10min 设置一个 40μl 的反应体系。为了免疫沉淀囊泡，设置 3 个 10min、100μl 的反应。为了进行一个两阶段的转运实验（见基本方案 4），设置一个 10min、100μl 的反应。
2. 将反应液置于 32℃水浴孵育，在设定的时间点将反应管置于冰上 2min，终止反应。
3. 4℃ 135 000g 离心 10min（如 Beckman TLA 100.3 转头），收集膜成分。加 40～90μl 预冷的重悬缓冲液，反复吹打使沉淀重悬。冰上放置 10min，继续吹打。
4. 加 0.1～0.2 倍体积的盐混合液，使乙酸钾的终浓度为 150mmol/L，乙酸镁终浓度为 2.5mmol/L。吹打混匀，并立即在 4℃ 16 000g，微量离心 5min。
5. 保留 80%的中速上清（MSS）。小心从中速沉淀中（MSP）吸去残留的液体。

测定出芽的速度/程度

6a. 4℃ 135 000g 离心 MSS 10min（如 Beckman TLA 100.3 转头）。小心吸去上清或用黄色移液吸头吸去，保留高速沉淀物（HSP）。

7a. 将 MSP 重悬于 50μl 1×SDS 上样缓冲液，HSP 重悬于 40ul 1×SDS 上样缓冲液。

8a. 取每种重悬的沉淀物 10～20μl 上样，用 7.5%的聚丙烯酰胺微型凝胶分离蛋白质（见单元 7.1）。将蛋白转移到硝酸纤维膜上，取抗 VSV-G 单克隆抗体 p5D4 和辣根过氧化物酶偶联二抗，用 BLOTTO 1∶10 000 稀释行免疫印迹（单元 7.7）。用密度测定法（单元 7.8）对信号进行定量并测定 HSP 中 VSV-G 相对 HSP 和 MSP 中总 VSV-G 的比率。

免疫沉淀法纯化囊泡

6b. 取 10min 时间点的 MSS 150～350μl，与 1×10^7 p5D4-Dynabeads 混合，加入免疫沉淀缓冲液使终体积为 372μl。再加 20μl FBS（终浓度 5%）和 8μl 100mmol/L EDTA（终浓度 2mmol/L），4℃旋转 2h 混匀。
7b. 用 500μl 免疫沉淀缓冲液清洗微珠 4 次，每次用磁性套管收集微珠。
8b. 向微珠中加入 1×SDS 上样缓冲液，煮沸 5min，溶解微珠上的囊泡，SDS-PAGE 电泳分析蛋白质。

提供第二阶段融合反应所用囊泡

6c. 如步骤 6a，从 100μl 的 10min 时间点反应液中制备 HSP。
7c. 将 HSP 重悬于 25μl 转运缓冲液中，置于冰上准备阶段 2 使用（见基本方案 4）。

支持方案 1　NRK 细胞微粒体膜的制备

注意：以下方法供 12 个培养皿微粒体的制备。

附加材料（同见基本方案 1；带√项见附录 1）

√PBS，冰冷
√匀浆缓冲液Ⅰ
√100×PIC
√乙酸钾缓冲液
√转移缓冲液
1ml 的球磨匀浆器（Balch and Rothman 1985）
39.5℃培养箱

1. 将 NRK 细胞培养于 12 个 150mm 的组织培养皿中，使其长成单层。
2. 制备组成为 4.5ml 无血清 α-MEM、0.5ml VSV ts045 病毒液（终浓度约 2×18^8 pfu/ml）和 25μl 1mg/ml 放线菌素 D（终浓度 5μg/ml）的感染混合液（一个平皿量）。向每个平皿中加入 5ml 感染混合液，32℃培养箱中持续摇动 45min（或每隔 5min 用手摇动），确保感染混合液分散均匀。
3. 向每个平皿中加入 20ml 含 5%FBS 的 α-MEM，39.5℃孵育 3h 又 40min（限定温度）。
4. 将每个平皿置于冰上，立即吸去培养液，用 10ml 预冷的 PBS 漂洗细胞。加 5ml 匀浆缓冲液Ⅰ，用橡皮细胞刮刮取细胞并转移到 3 个置于冰上的 50ml 的聚丙烯管中，每 4 个平皿中收集的细胞加到 1 个管中。重复刮取过程 1 次。
5. 4℃ 720*g* 离心 3min，吸去上清。用含有 1×PIC 的匀浆缓冲液Ⅰ0.9ml 重悬各细胞沉淀。用 1ml 球磨匀浆器匀浆细胞 3 次。
6. 合并所有细胞匀浆，加等体积含有 1×PIC 的匀浆缓冲液Ⅰ。将稀释的匀浆液分成 6

个 1ml，等分到 1.5ml 微量离心管中，4℃ 720g 离心 5min。

7. 将每份核后上清转移到一个 15ml 聚丙烯管中。加 0.5 倍体积的乙酸钾缓冲液，混匀，将其以 0.8～1ml 等量分装到 1.5ml 离心管中，4℃ 12 000g 离心 2min。
8. 吸去上清，将所有沉淀重悬于总体积 1ml 的含有 1×PIC 的转运缓冲液中，取 2 个微量离心管，每管加入 0.5ml，4℃ 12 000g 超速离心 2min。
9. 用含有 1×PIC 的 6～8 倍体积的转运缓冲液重悬微粒体沉淀，合并微粒体，并以 50～100μl 等量分装，液氮冷冻，－80℃可保存几个月。

支持方案 2　VSV ts045 病毒的繁殖

本方案所使用的 VSV ts045 病毒株来自于被感染的幼稚仓鼠肾细胞。

材料（带√项见附录 1）

幼仓鼠肾（BHK）细胞（ATCC）
格拉斯哥极限必需培养基（G-MEM；Life Technologies）
胰蛋白磷酸肉汤（TPB；Sigma）
√FBS
√TD 缓冲液
水疱性口炎病毒（VSV）ts045（印第安纳血清型；感染多样性为 0.1；ATCC）
32℃培养箱

1. 将 BHK 细胞培养在直径 100mm 的组织培养皿中，使用含有 10%（v/v）TPB 和 5%（v/v）FBS 的 G-MEM 培养液，待细胞长成单层，用 TD 缓冲液清洗细胞。
2. 加 10ml 含有约 10^6 pfu 的 VSV ts045 病毒的 G-MEM/10%TPB。32℃培养箱孵育 36～48h（直到细胞开始变圆）。
3. 取培养液，内含已经增殖的病毒，4℃ 720g 离心 10min。将上清以 100μl 等量分装，液氮冷冻，－80℃可长期保存。

基本方案 4　内质网囊泡与高尔基体膜的融合

本实验用于检测内质网囊泡与纯化的高尔基体膜的融合。

材料（带√项见附录 1）

内质网囊泡（HSP；见基本方案 3，步骤 8c）
脱盐的鼠肝细胞细胞液（见支持方案 3）
浓缩的鼠肝细胞高尔基膜（见支持方案 4）
1×HEPES 酸，pH7.4
0.1mol/L 乙酸镁
√10×Ca^{2+} 缓冲液

√20×ATP 再生系统

40mmol/L UDP-*N*-乙酰葡萄糖胺

2.5mol/L 山梨糖醇

√Endo H 缓冲液

溶于 0.1mol/L pH5.6 乙酸钠溶液的 75mU/ml 内切糖苷酶 H（endoH；Boehringer）

√4×SDS 上样缓冲液

抗 VSV-G 的单克隆抗体 p5D4（Kreis 1986）

辣根过氧化物酶（HRP）偶联二抗

37℃水浴

表 12.3.4 内质网囊泡与高尔基体膜的融合反应体系组成

溶　　液	加入体积/μl	终浓度
HSP[a]	10	
脱盐的大鼠肝细胞细胞液	8	4mg/ml
高尔基体膜	4	1.5mg/ml
1mol/L HEPES 酸（pH7.4）	1.25	25mmol/L
0.1mol/L 乙酸镁	1.25	2.5mmol/L
10×Ca^{2+} 缓冲液	5	1×
20×ATP 再生液	2.5	1×
40mmol/L UDP-*N*-乙酰葡萄糖胺	1.25	1mmol/L
2.5mol/L 山梨糖醇	3.6	180mmol/L
水	至 50 μl	

a. HSP，高速离心沉淀物。

1. 如表 12.3.4 所示配制反应混合液。进行两组相同的反应，包含两个阴性对照，完全反应液在冰上孵育；不加高尔基膜的反应液在 32℃孵育。所有反应液 32℃水浴孵育 75min。
2. 将反应管置于冰上终止反应。4℃ 135 000*g* 离心 10min，收集膜沉淀。
3. 将沉淀重悬于 20μl 的 Endo H 缓冲液，煮沸 5min，短暂离心，冷却。加 40μl 用 0.1mol/L 乙酸钠配制的 pH5.6 浓度为 75mU/ml 的 Endo H（3mU），37℃水浴孵育过夜。
4. 加入 20μl 4×SDS 上样缓冲液终止反应。在 6.75%（w/v）聚丙烯酰胺大凝胶上分离 Endo H 敏感性和抗性 VSV-G（单元 7.1）。
5. 用 Tris/甘氨酸/甲醇转移缓冲液，在 40V 电压下转移 6.5～10h，将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上，取抗 VSV-G 单克隆抗体 p5D4 和辣根过氧化物酶偶联二抗，用 BLOTTO 以 1∶10 000 稀释进行免疫印迹（单元 7.7）。用密度测定法定量测定不同形式 VSV-G 的强度。

本方案中只能检测到 G_{H0} 和 G_{H1} 两种类型。

支持方案 3　制备大鼠肝细胞细胞液

注意： 所有使用活体动物的方案必须首先通过动物保护和使用委员会的审查和批准，或者必须遵守政府有关实验室动物保护和使用的规定。

材料（带√项见附录 1）

　雄性 Sprague-Dawley 大鼠
√PBS，冰冷
√细胞液缓冲液，冰冷
　100mmol/L ATP
√100×PIC
　40ml Dounce 匀浆器，配有 A 型（紧密型）和 B 型（疏松型）研杵
　粗纱布
　SepHadex G-25M/PD-10 层析柱（Amersham Pharmacia Biotech）

1. 取两只雄性 Sprague-Dawley 大鼠，处死后取肝脏并称重（约 15～20g）。
2. 用 50ml 预冷的 PBS 漂洗肝脏组织 3 次，再用 50ml 预冷的细胞液缓冲液漂洗 2 次，加 3 倍体积（体积/每克湿重肝组织）含有 1mmol/L ATP 和 1×PIC 的预冷细胞液缓冲液，然后用剪子在冰上将组织剪碎。
3. 将组织碎块放入匀浆器中，用 B 型研杵（疏松型）手动抽提 10 次，再用 A 型研杵（紧密型）抽提 10 次。
4. 用粗纱布将匀浆产物过滤到置于冰上的烧杯中，4℃ 12 000*g*（如 Beckman JA-20 转头），离心过滤产物 10min。
5. 将上清转移到合适的离心管中（例如，为 Beckman SW41 转头配备），4℃ 150 000*g* 离心 90min。
6. 吸去表面脂层液体，保留剩余上清（细胞液），以每管 250μl 分装，液氮冷冻，－80℃可保存 6 个月。

   该细胞液用于基本方案 1 和备择方案 2

7. 在冷室中，将细胞液除盐。取下 Sephadex G-25M/PD-10 层析柱的盖子，加入 25ml 预冷的含有 1×PIC 的胞浆缓冲液平衡柱子。
8. 精确取细胞液 2.5ml，加到柱子顶部，让液体完全流过柱子，弃去流出液。再精确加入 3.5ml 预冷的含有 1×PIC 的细胞液缓冲液洗脱柱中蛋白质。
9. 等量分装过滤得到的细胞液，每管 100μl，液氮冷冻，－80℃可保存 6 个月。

   凝胶过滤得到的细胞液用于基本方案 4

支持方案 4　从大鼠肝细胞制备高尔基体膜

注意： 所有使用活体动物的方案必须首先经过动物保护和使用委员会的审查和批

准，或者遵守政府有关实验室动物保护和使用的规定。

材料（带√项见附录1）

雄性 Sprague-Dawley 大鼠
√匀浆缓冲液Ⅱ，冰冷
√100×PIC
pH7.4 10mmol/L Tris·Cl(见配方)配制的蔗糖溶液:0.5mol/L(折光率1.3575)，1.0mol/L（1.3815），1.1mol/L（1.3865），1.25mol/L（1.3939），2.35mol/L（1.4464）
√稀释缓冲液
√转运缓冲液
匀浆器（Potter-Elvehjem 组织研磨机，C型）和0.026in（66mm）间隙和0.012in（30mm）间隙 Teflon 研杵。
粗纱布
折光仪
18G 针头

1. 取两只雄性 Sprague-Dawley 大鼠，处死后取肝脏，置于吸水纸上称重（15～20g）。
2. 将组织放在烧杯中，加5倍体积（w/v）预冷的含有1×PIC的匀浆缓冲液Ⅱ，用剪刀将组织剪成小碎块。
3. 将组织碎块放入匀浆器中，1000r/min 机械匀浆组织。使用具有0.026in（66mm）间隙的研杵，研磨3次，再使用0.012in（30mm）间隙的研杵，研磨3次。
4. 用粗纱布将匀浆产物过滤到置于冰上的烧杯中。用10ml预冷的匀浆缓冲液Ⅱ清洗纱布上的残留物。4℃ 1450*g*（如 Beckman JA-20 转头）离心过滤的匀浆产物10min，收集上清液。
5. 取上清液30ml铺加在8ml 1.25mol/L的蔗糖溶液上（如 Beckman SW28 管），4℃ 112 000*g* 离心90min。
6. 吸去上层液体，用巴斯德吸管收集处于0.5mol/L/1.25mol/L界面的膜溶液。用折光仪测定该溶液蔗糖浓度，并用2.35mol/L的蔗糖溶液调节其浓度为1.2mol/L（折光率1.3915）。
7. 取膜溶液13ml加在SW28管的底部，上面覆以10ml 1.1mol/L蔗糖溶液、10ml 1.0mol/L蔗糖溶液和5ml 0.5mol/L蔗糖溶液。4℃ 112 000*g* 离心2.5h。
8. 使用18G针头收集0.5mol/L/1.0mol/L交界处的条带。等量分装于1.5ml的微量离心管中，每管300μl，再加入4倍体积的稀释缓冲液，4℃ 16 000*g* 离心10min。

   此次离心后膜成分敷在管壁上而不是形成压紧的沉淀。
9. 弃去上清，小心使沉淀重悬于0.5ml转运缓冲液中。收集两个管中的膜溶液，依步骤8重复离心。
10. 用总量4ml的转运缓冲液重悬膜沉淀。等量分装成每份75～100μl，液氮冷冻，－80℃可保存3个月。

参考文献：Balch and Rothman，1985；Schwaniger et al.，1991
撰稿人：Bernard B. Allan and William E. Balch

单元 12.4 用洋地黄皂苷透化细胞进行核物质输入

核输入实验已经用于检测和验证核物质输入所需要的因子，最近也被用来研究核物质的输出过程。

基本方案 贴壁型 HeLa 细胞中的核物质输入

注意： 用于组织细胞培养的所有溶液和装置必须是无菌的，同时要根据情况使用适合的无菌技术。除非有特殊要求，所有组织的培养均应在湿润的、37℃、5%CO_2 条件的培养箱中进行。一些培养基（如 DMEM）还需要改变的 CO_2 浓度来维持 pH 为 7.4。

材料（带√项见附录 1）

70%乙醇
HeLa 细胞（ATCC CCL-2）：30 000 个/ml 完全 DMEM（含 10%FBS）
√DMEM/10%FBS
√1×转运缓冲液，冰冷
√洋地黄皂苷工作液，冰冷
√输入反应混合液
√多聚甲醛工作液，冰冷
√对苯二胺封片剂
干净的指甲油
高压灭菌的 12mm 的圆形玻璃盖片（Fisher）
24 孔组织培养板
Whatman 3MM 滤纸
大弯柄尖头镊子（如 Dumont #7，Fine Science Tools）
荧光显微镜

1. 用经 70%乙醇消毒并空气干燥的镊子夹取 12mm 盖片，放在 24 孔板的孔中。加 1ml DMEM（含 10%FBS）培养的 HeLa 细胞，细胞密度为 30 000 个/ml 培养液。将培养板放入培养箱培养 16h。
2. 将培养板冰上放置 5min。吸去培养液，小心加入 1ml 预冷的 TB。吸去 TB，加入 1ml 预冷的洋地黄皂苷工作液，冰上孵育 5min。
3. 吸去洋地黄皂苷工作液，加入 1ml 预冷的 TB，继续在冰上放置 30min。
4. 将封口膜放在实验台上，确保其平整，并以 24 孔板相同的方式标上数字（即 6 列），在封口膜与每个孔相对应的位置上滴加 40μl 输入反应液。用镊子从孔中取出盖片，并用滤纸从边缘吸去多余的 TB。小心地将每一张盖片倒置（细胞面向下）放在相对

应的输入混合液的液滴上。

5. 用不透光的圆盘盖在反应物上，防止荧光淬灭，室温孵育 15min。
6. 轻轻地将预冷的 250ml TB 加在盖片下面终止输入反应，并使盖片从封口膜上浮起，小心取下盖片，将细胞面朝上放回到置于冰上的、加有 TB 的 24 孔板中。
7. 吸去 TB，在每张盖片上加 1ml 新鲜预冷的 TB。吸去 TB，加 1ml 预冷的 3%多聚甲醛。覆盖使其避光，冰上孵育 15min。
8. 取出盖片，用滤纸吸去多余的固定液，并轻轻地将盖片倒置（细胞面向下）在滴有一小滴封片剂的载片上，使盖片的上面干燥 5min，然后用指甲油封闭盖片边缘。
9. 使用荧光显微镜在 63×或 100×油镜下观察。

记录结果的最简单的方式是照相。为了确保某一特定图像中不同区块结果的可比性，不同样品在照相时应使用相同的曝光时间，打印时也应使用相同条件。不同样品间荧光强度的相对差异通常是可以重现的。某一特定图像的相关样品应在同一实验中检测。

支持方案 1　制备非洲爪蟾卵细胞细胞液

注意：所有使用活体动物的方案必须首先经过动物保护和使用委员会的审查和批准，或者遵守政府有关实验室动物保护和使用的规定。

材料（带√项见附录 1）

8 只雌性非洲爪蟾
√PBS，冰冷
蛋白酶抑制剂药片（Boehringer Mannheim Complete，无 EDTA）
√1×匀浆缓冲液，冰冷
√1×转移缓冲液（TB），冰冷
带管的 CO_2 罐
Polytron 匀浆器，PR300D（PRO Scientific）
250ml 塑料离心瓶
Sorvall 离心机，配有 GSA 离心转头（或相当装置）
粗纱布
Beckman 超速离心机，配有 Ti70.1 转头（或相当装置）和相应的超速离心管
薄壁塑料管
20ml 注射器
透析管（袋）（4000～6000MWCO）
Centiplus-10 浓缩器（Amicon）

1. 将爪蟾和水放入一只加盖的桶中，桶的顶部钻有两个吸管头大小的气体交换孔。在通风橱中向桶内的水中持续注入 CO_2 20min，将蟾蜍处死。将处死的蟾蜍放在冰中保持冰冷。

从 8 个爪蟾可制备得到大约 350mg 细胞液。

2. 按照图 12.4.1 取蟾蜍卵巢，放在置于冰上的、装有 1L 预冷 PBS 的烧杯中。收集完所有的卵巢后，用总量 4L 的预冷 PBS 洗几次，每次洗后静置使卵巢沉降，去除上清。
3. 将卵巢放在装有预冷 PBS 的大容量刻度量筒中，测量卵巢的湿体积。
4. 用镊子取出卵巢，用面巾纸蘸去多余的液体，然后转入一个塑料烧杯中。加等体积预冷的含有蛋白酶抑制剂的匀浆缓冲液（每 50ml 缓冲液加 1 片）。
5. 用 Polytron 匀浆器在相对低的设置下，进行几次短时匀浆（每次 5～10s），不要产生泡沫。

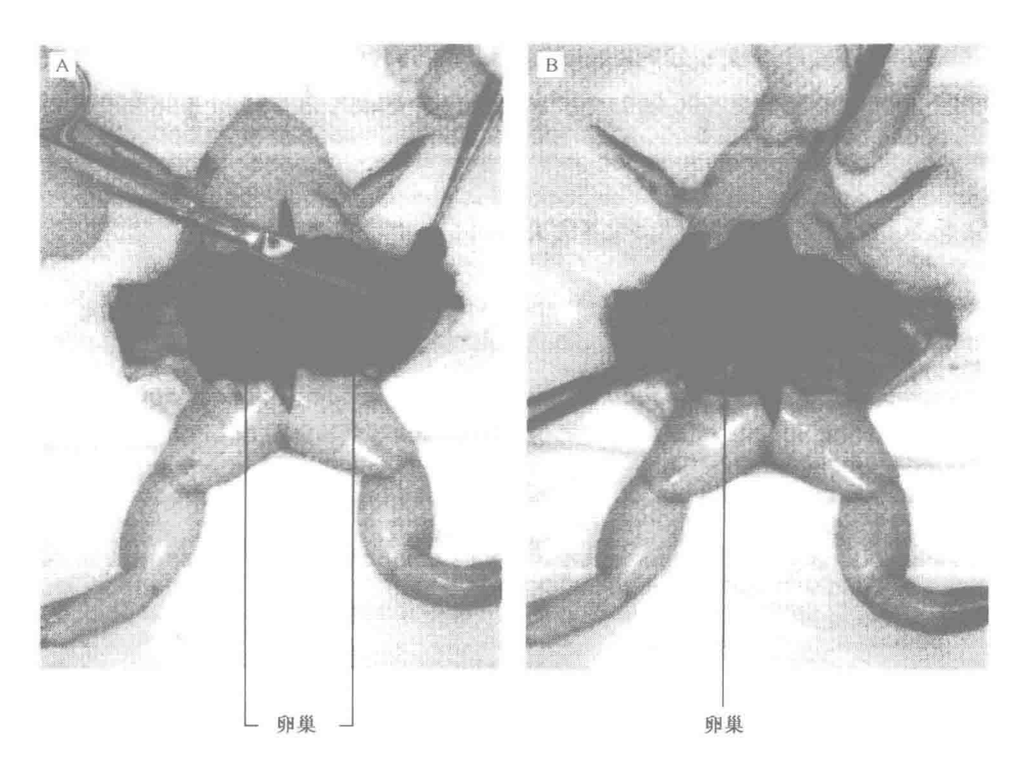


图 12.4.1 非洲爪蟾卵巢解剖图

图中显示为暴露的雌性非洲爪蟾的腹腔。(A) 当打开腹腔时，卵巢是可以看到的最明显的器官；(B) 用镊子轻轻提起卵巢，在尽可能接近卵巢组织处切割卵巢

6. 将匀浆液转移到 250ml 的塑料离心瓶中，用 GSA 转头，4℃ 16 000*g* 离心 20min。倒出上清液，尽可能避去漂浮的脂肪层。用几层粗纱布过滤上清液，弃去沉淀和脂肪层。
7. 将上清液转移到超速离心管中，用匀浆缓冲液加满最后一个管。用 Ti70.1 转头，4℃ 150 000*g* 离心 2h。
8. 把薄壁管子连在一个 20ml 的注射器上。将管长度的一半插到离心管中，位于漂浮的脂肪层和底部松散的黄色沉淀之间，抽取澄清的中间层。
9. 将获得的细胞液移入透析管中（4000～6000MWCO），用总量 6L 的 TB 4℃透析。更

换 3 次透析液，最后一次透析过夜。

10. 将透析产物移入超速离心试管中，用 Ti70.1 转头 4℃ 16 000g 离心 1h。
11. 采用 Bio-Rad 蛋白质分析法对获得的细胞液进行蛋白质分析（附录 3B）。用 Centriplus-10 浓缩器将细胞液浓缩到每毫升含 20mg 蛋白质。
12. 将浓缩的细胞液等量分装，快速冻存，－80℃可保存 6～8 个月。

    550μl 10mg/ml 分装量的细胞液足够用于 24 张盖片。

支持方案 2　制备荧光标记的核输入性底物 TRITC-BSA-NLS

材料（带√项见附录 1）

Sephadex G-25 和 G-50（Amersham Pharmacia Biotech）
√0.1mol/L 磷酸钠 pH7.0 和 pH8.0，冰冷
牛血清白蛋白，无脂肪酸（Boehringer Mannheim）
0.1mol/L 碳酸钠，pH9.0/50mmol/L NaCl（室温长期保存）
四甲基罗丹明－5（和 6）－异硫氰酸盐（TRITC；分子探针）
二甲基亚砜（DMSO）
√1.5mol/L 盐酸羟胺 pH8.5
Sulfo-SMCC（Pierce）
NLS 肽或突变型 NLS 肽（约 1mg）
20mmol/L HEPES（钾盐）pH7.3/110mmol/L 乙酸钾（现配）
√1×转运缓冲液（TB）
20ml 一次性层析柱（Bio-Rad Laboratories）
转动平台
Centricon-30 浓缩器（Amicon）

1. 使用20ml 的一次性层析柱制备 3 个 15ml 柱床体积的脱盐柱，柱中填入下列填料：

    Sepharose G-25，用 0.1mol/L 磷酸钠 pH7.0 平衡
    Sepharose G-25，用 0.1mol/L 磷酸钠 pH8.0 平衡
    Sepharose G-50，用 0.1mol/L 磷酸钠 pH7.0 平衡

    每个柱子在 4℃，至少用 75ml 相应的预冷磷酸缓冲液平衡。

2. 将 10mg BSA 溶解到 1ml 0.1mol/L 的碳酸钠（pH9.0）/50mmol/L NaCl 中。取该溶液 20μl，4℃保存，作为对偶联产物进行 SDS-PAGE 分析的标准对照。

    该方案可产生约 8mg 输入底物 TRITC-BSA-NLS

3. 取 TRITC 0.4mg，溶解于 40μl DMSO 中。将 12.5μl 的 TRITC/DMSO 溶液加到溶解的 BSA 中，每次加入 2.5μl 并混匀。当所有的 TRITC 加入完毕后，用锡箔纸包裹反应管，转动平台上室温孵育 1h。
4. 在 TRITC-BSA 中加入 100μl pH8.5 1.5mol/L 的盐酸羟胺，锡箔纸包裹，再在转动平台上室温孵育 1h。4℃ 15 000g 离心 10min，保留上清。
5. 将 TRITC-BSA 加到 15ml 用 0.1mol/L pH8.0 磷酸钠平衡的 Sephadex G-25 柱子上

(见步骤 1)。用 0.1mol/L pH8.0 的磷酸钠洗脱，收集洗脱液，每次 1ml。合并含有第一个红色洗脱峰的组分。

6. 用 Centricon-30 浓缩器浓缩洗脱液到 0.5ml。取 10μl 4℃保存，作 SDS-PAGE 分析用。
7. 取 sulfo-SMCC 2mg，溶解于 200μl 水中（终浓度为 23mmol/L）。取 sulfo-SMCC 166μl 加到 TRITC-BSA 中，用锡箔纸包裹，37℃孵育 30min，每 5min 轻轻涡旋一次。
8. 4℃ 15 000*g* 微量离心 10min，收集上清。将样品加到 15ml 用 0.1mol/L pH7.0 磷酸钠平衡的 SepHarose G-25 柱子上（见步骤 1），用 0.1mol/L pH7.0 的磷酸钠洗脱，收集洗脱液，每次 1ml。合并红色洗脱峰的组分，该洗脱液为 sulfo-SMCC 激活的 TRITC-BSA 。取 20μl 保存，用作 SDS-PAGE 分析。
9. 加 5～20 倍摩尔过量 NLS 肽到 TRITC-BSA-solfo-SMCC 中，用锡箔纸包裹，4℃于转动平台上孵育过夜。
10. 4℃ 15 000*g* 离心 10min，除去不溶物，用 Centricon-30 浓缩器浓缩到 0.75ml。
11. 将浓缩的 TRITC-BSA-NLS 加到 15ml 用 0.1mol/L pH7.0 磷酸钠平衡的 Sepharose G-50 柱子上。用 0.1mol/L pH7.0 的磷酸钠洗脱，收集洗脱峰组分，每次 1ml。合并红色洗脱峰组分，内含 TRITC-BSA-NLS。
12. 用总量 3L 的 pH7.3 20mmol/L 的 HEPES（钾盐）/110mmol/L 乙酸钾，4℃透析（附录 3 C)。更换透析液 3 次，最后一次过夜透析。4℃ 10 000*g* 离心透析液 10min。收集上清，取 20μl 保存，作 SDS-PAGE 分析用。
13. 用 Bio-Rad 蛋白分析法（附录 3B）测定蛋白质浓度。如果有必要，用 Centricon-30 浓缩。

    输入底物储存液的浓度至少应为工作浓度的 40 倍。通常 TRITC-BSA-NLS 偶联物在 5～10 μg/ml 的浓度时可以获得最大的输入量。

14. SDS-PAGE 分析步骤 2、6、8、12 收集保存的样品。
15. 等量分装偶联物溶液，液氮冰冻，－80℃可保存 1 年。
16. 使用时，取分装液体在 37℃水浴快速融化，用 TB 稀释至 40 倍，4℃ 15 000*g* 离心 20min。将上清液移入一个新的管中，4℃避光可保存 1 个月。

支持方案 3　制备荧光标记的重组核输入性底物 GFP-GST-NLS

材料（带√项见附录 1)

√含 100 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基

E. coli DH5α 菌株

含有 GST-GFP-NLS 和 GST-GFP-突变型 NLS 的大肠杆菌菌株（Dr. Manfred Lohka，Biological Sciences，University of Calgary，Calgary，Canada)

水配制的 1mol/L IPTG ，过滤除菌

√磷酸盐缓冲液（PBS)

蛋白酶抑制剂（药片）(Boehringer Mannheim Complete，无 EDTA)

√PBS/EDTA
10%（v/v）TritonX-100
谷胱甘肽-Sepharose 4B（Amersham Pharmacia Biotech）
√谷胱甘肽/Tris
pH7.3 20mmol/L HEPES（钾盐）/110mmol/L 乙酸钾（现配）
√转运缓冲液（TB）
摇床
Sorvall 离心机，配有 GSA 和 SS-34 转头（或相当设备）
50ml 锥形离心管
French Press 细胞压碎仪或超声破碎机
转动平台
2ml 一次性层析柱（Bio-Rad）
Centricon-30 浓缩器（Amicon）

1. 取含有 GST-GFP-NLS 的单克隆 *E. coli* DH5α，接种于 250ml 加有氨苄青霉素（100 μg/ml）的 LB 培养基中。37℃ 300r/min 过夜振荡培养。
   1L 培养基中可获得约 9mg 的 GST-GFP-NLS。
2. 将过夜培养的菌液加到 750ml LB 培养基中，混匀并分别加至 2 个烧瓶中，每个加 500ml。加入 IPTG（取自 1mol/L 储存液）至终浓度为 0.4mmol/L。28℃振荡培养 24h。
3. 用 GSA 转头，4℃ 4000*g* 离心 10min，收集细胞，弃去上清。
4. 将沉淀的细胞重悬于总体积 15ml 的 1×PBS 中，然后将悬液转移到一个 50ml 的锥形离心管中。再取 3ml PBS 冲洗离心瓶，将冲洗液与细胞悬液合并。充分涡旋将菌体沉淀完全重悬。
5. 取一片蛋白酶抑制剂，用 1ml 1×PBS/EDTA 溶解后加到重悬液中，再加 3ml 10% 的 TritonX-100（终浓度 1%），加 1×PBS/EDTA 至总体积 30ml，涡旋混合。用预冷的 French Press 细胞压碎仪以 16 000psi 压力破碎细胞。
6. 用 SS-34 转头或其他相当装置，4℃ 16 000*g* 离心 20min 使裂解液澄清，弃去沉淀。
7. 小心将储存瓶中的谷胱甘肽-Sepharose 4B 重悬。取 2ml（相当于 1.5ml 压紧的树脂）加到 50ml 锥形离心管中，500*g* 离心 2min，沉淀树脂并弃去上清。将树脂重悬于 30ml 1×PBS/EDTA 中，500*g* 离心 5min，沉淀树脂，弃去上清。
8. 将步骤 6 得到的澄清裂解液加到 50ml 含有谷胱甘肽-sepharose 4B 的锥形离心管中，颠倒混匀，于 4℃轻轻摇动孵育 2h。
9. 在冷室中，将步骤 8 得到的树脂/裂解液加到 2ml 一次性层析柱中，收集流出液以备分析用。用 50ml 预冷 PBS 冲洗柱子，在加 PBS 时应尽量减少对柱床的扰动。最后一次冲洗后，缓冲液的弯月面可处于接近柱床顶部的位置，然后将柱子塞上。
10. 取 10ml 谷胱甘肽/Tris 加到柱床顶部，室温下洗脱 GFP-GST-NLS。取下柱上的塞子，收集洗脱组分于 1.5ml 微量离心管中，每次 1ml。连续洗脱直到柱床几乎呈白色而洗脱液几乎无色。收集洗脱液时要将其置于冰上并避光，最后合并所有绿色洗

脱液组分。

11. 用总体积 3L 的 pH7.3 20mmol/LHEPES（钾盐）/110mmol/L 乙酸钾，4℃透析（见附录 3C）。更换缓冲液 3 次，最后一次过夜透析。用 SS-34 转头，10 000g 离心透析液 20min，保存上清。
12. 用 Bio-Rad 蛋白分析法（见附录 3B）测定蛋白质浓度。如果有必要，用 Centricon-30 浓缩。用 SDS-PAGE 测定蛋白质纯度（见单元 7.1）。

    作者发现，在核输入实验中，上述底物在浓度为 25～50 μg/ml 时活性最大。方便的做法是将底物至少浓缩到其终浓度的 40 倍，即 2mg/ml。
13. 将上清分装，液氮冷冻，－80℃保存。
14. 进行输入实验的预试验（见基本方案）以确定输入底物的最佳浓度，可在 0～100 μg/ml 之间设定几个浓度进行试验。
15. 使用时，将分装的液体快速置于 37℃水浴解冻，然后用 TB 将步骤 14 中所确定的最佳浓度值稀释 40 倍。4℃ 15 000g 离心 10min，弃去沉淀的蛋白质，将上清移至一个新管中。4℃避光可保存几周。

参考文献：Adam et al.，1990；Moore and Blobel，1992

撰写人：Mary Shannon Moore and Eric D. Schwoebel

单元 12.5　非洲爪蟾间期卵提取物的制备和使用

非洲爪蟾分裂间期卵细胞提取物是体外细胞活动重建实验中细胞质和细胞器成分的重要来源，可进行去膜精子染色质的核组装、核蛋白的输入以及 DNA 的复制。

注意：所有使用活体动物的方案必须首先通过动物保护和使用委员会的审查和批准，或者必须遵守政府有关实验室动物保护和使用的规定。

基本方案 1　制备分裂间期卵提取物

材料（带√项见附录 1）

雌性非洲爪蟾卵细胞，保存于 100mmol/L NaCl（见支持方案 1）
2%（w/v）L-半胱氨酸碱（Sigma），水配制
√0.25×改良 Ringer 液（MMR）pH7.7
√卵细胞裂解缓冲液 pH7.7
5mg/ml 细胞松弛素 B（Calbiochem，溶于 DMSO）
5mg/ml 抑肽酶（Roche Diagnostics），溶于水
5mg/ml 亮抑蛋白酶肽（Roche Diagnostics），溶于水
10mg/ml 放线菌酮，溶于水
200ml 烧杯
100ml 的玻璃培养皿
巴斯德吸管
解剖显微镜

15ml 锥形聚丙烯离心管

IEC 临床用离心机

Sorvall HB-4 旋翼式转头

带有 18 号针头的 5ml 注射器

1. 将卵细胞收集到 200ml 玻璃烧杯中，倒掉多余液体。用 2%的 pH8.0 L-半胱氨酸溶液漂洗卵细胞一次，然后以每只爪蟾 100ml 的量加入 2%半胱氨酸溶液，继续室温孵育 5min，定时轻轻旋转。
2. 倒掉半胱氨酸溶液，并用 0.25×MMR 漂洗卵细胞，倾斜倒去碎屑，重复 2 次。把卵细胞倒入一个 100ml 的玻璃培养皿中，最好在解剖显微镜下用巴斯德吸管将平皿中不好的细胞吸去。

   成熟爪蟾卵细胞的上半部是深色的，下半部是浅色的。在深色部分的中央应该有一个小的白色斑点，是卵母细胞成熟过程中（胚泡裂解）由于核裂解产生的。虽然该斑点肉眼可见，但使用解剖显微镜则更容易观察。没有白色斑点的细胞是卵母细胞，应该除去。那些白色的、变大的或是颜色不均匀的细胞也应被除去。
3. 用卵细胞裂解缓冲液漂洗细胞 2 或 3 次，每次倒掉缓冲液，要小心尽量不要倒丢细胞。用倒置的巴斯德吸管（吸耳球接在细端）将细胞转移到 15ml 的聚丙烯管中。
4. 临床用离心机 400g 离心 15s，倾斜倒掉沉降细胞上部的多余缓冲液。
5. 根据沉降细胞的体积，直接将下列溶液加到离心压紧的卵细胞上：

   5 μg/ml 抑肽酶（5mg/ml 储存液 1∶1000 稀释）

   5 μg/ml 亮抑蛋白酶（5mg/ml 储存液 1∶1000 倍稀释）

   5 μg/ml 细胞松弛素 B（5mg/ml 储存液 1∶1000 稀释）

   5 μg/ml 10mg/ml 放线菌酮（终浓度 50 μg/ μl）
6. 用 Sorvall HB-4 旋翼式转头，4℃ 12 000g 离心 15min，裂解卵细胞。

   裂解后的细胞分为三层：顶部的黄色脂质层、中间的间期细胞粗提物和底部的黑色沉淀（见图 12.5.1B）。

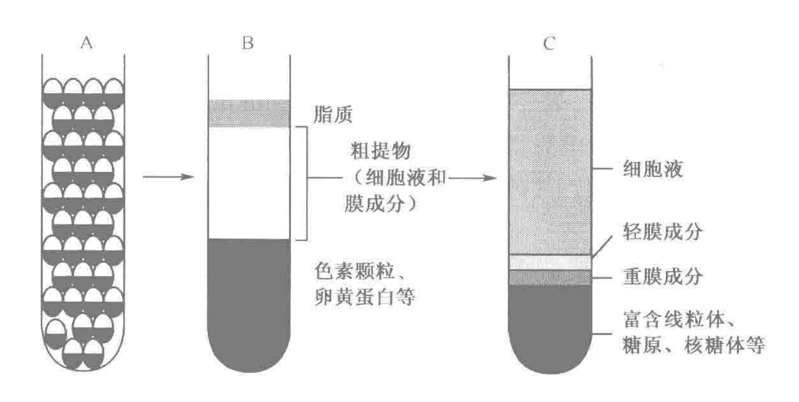


图 12.5.1　分裂间期卵提取物的制备

(A) 通过低速离心将离心管中的卵细胞压实；(B) 进一步在 12 000g 下离心得到脂质层、粗提物层以及色素颗粒层；(C) 粗提物可被进一步分级分离，得到细胞液、轻膜成分以及富含线粒体的重膜成分

7. 用带有 18G 针头的 5ml 注射器从侧面刺穿聚丙烯管，吸取间期细胞粗提物，冰上放置 1h。

   该提取物在冰冻/融化后不能进行核组装。

备择方案 1 制备间期细胞的分级分离提取物

附加材料（同见基本方案 1）

间期细胞粗提物（见基本方案 1）

2.5ml 超净离心管

TLS 离心机和 TLS-55 转头（Beckman）或其他相当装置

1. 如果这一步还没有进行（见基本方案 1，步骤 5），则向被分离的间期细胞粗提物中补加 5 μg/ml 抑肽酶（5mg/ml 储存液 1∶1000 稀释）、5 μg/ml 亮抑蛋白酶（5mg/ml 储存液 1∶1000 稀释）和 5 μg/ml 细胞松弛素 B（5mg/ml 储存液 1∶1000 稀释）。
2. 将提取物移入 2.5ml 超净离心管中，用 Beckman TLS-100 离心机，4℃ 250 000*g* 离心 70min。
3. 将提取物置于冰上，用 200μl 移液器吸头吸取澄清的细胞液成分，小心操作避免破坏轻膜成分层，将细胞液成分和膜成分分层置于冰上保存（见图 12.5.1C）。
4. 将细胞液成分移入一个新的 2.5ml 超净离心管中，4℃ 250 000*g* 离心 25min。收集上层的细胞液成分（步骤 3），以 50μl 或 100μl 等量分装于微量离心管中。液氮冻存，−80℃保存，备用。

   在上述离心过程中应同时进行步骤 5 和步骤 6。
5. 使用带有大口吸头或去尖端吸头的微量移液器，小心从步骤 3 中得到的膜成分层中吸出轻膜成分，弃去未被扰乱的暗膜成分。用 1.5ml 卵细胞裂解缓冲液稀释所有的轻膜成分，冰上保存，以备步骤 7 使用。
6. 取蔗糖 0.42g，加 5ml 卵裂解缓冲液，配成 2×蔗糖/卵细胞裂解缓冲液，4℃冷却。
7. 将稀释的膜成分（步骤 5）置于 2.5ml 超净离心管中，准备离心。用巴斯德吸管将 2×蔗糖/卵细胞裂解缓冲液加到装有膜成分管的底部作为膜成分的垫层，然后在管中加满缓冲液，用 TLS-55 转子 4℃ 26 000*g* 离心 20min。
8. 弃去澄清的缓冲液，使管中只留下膜成分。使用大口吸头将膜成分以 5～10μl 等量分装于 0.5ml 微量离心管，速冻，−80℃保存，备用。

支持方案 1 用注射方法获得非洲爪蟾卵细胞

非洲爪蟾应饲养在干净、去氯的自来水中，其最大饲养密度为每升水一只（尽管较为理想的是采用更低的饲养密度）。虽然采用将自来水储存在开放的容器中通气 24h 的方法可以脱氯，但更快的方法是采用含碳滤膜过滤水。非洲爪蟾产卵的最佳饲养温度是 18℃。非洲爪蟾可喂食各种饲料，但最容易获得的是 Nasco 或 Purina trout chow 的爪蟾饲料（1g/非洲爪蟾，3～4 天/周）。喂食日后应该换水。

材料（带√项见附录 1）

成熟雌性非洲爪蟾（如 Nasco、Xenopus Ⅰ或 Xenopus Express）

100mmol/L NaCl：25g NaCl/5L H_2O

200U/ml 孕马血清促性腺激素（PMSG；Calbiochem）：将粉末溶解于灭菌水中，使终注射体积为 0.5ml（即终浓度为 200U/ml），等量分装保存于－20℃。

1000U/ml 人绒毛膜促性腺激素（HCG；Sigma 或 Amersham/USB）：将粉末溶解于灭菌水中，使终注射体积为 0.5ml（即终浓度为 1000U/ml），4℃可储存 1 个月以上。

√1×改良 Ringer 液（MMR；可选）

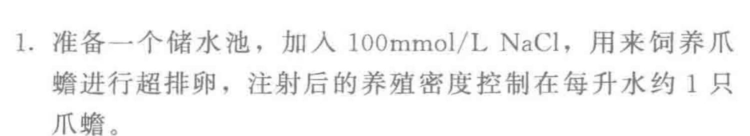
储水池

1ml 注射器

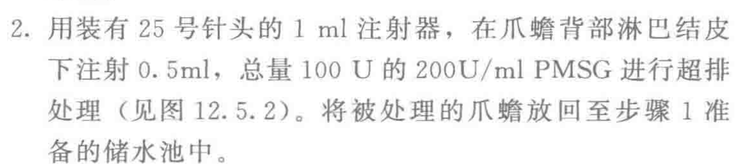
25 号针头



图 12.5.2　爪蟾注射部位
注射部位为背部淋巴结，位于腿上部与躯干连接处。从较为松弛的皮肤皱褶处注射，不要将针向下推人肌肉中



1. 准备一个储水池，加入 100mmol/L NaCl，用来饲养爪蟾进行超排卵，注射后的养殖密度控制在每升水约 1 只爪蟾。



2. 用装有 25 号针头的 1 ml 注射器，在爪蟾背部淋巴结皮下注射 0.5ml，总量 100 U 的 200U/ml PMSG 进行超排处理（见图 12.5.2）。将被处理的爪蟾放回至步骤 1 准备的储水池中。
3. 2～3d 后，给爪蟾注射 0.5ml 的 1000U/ml HCG（总量为 500 U）诱导产卵，注射方法同 PMSG（步骤 2）。注射后，将每只爪蟾置于 5L 100mmol/L NaCl 中（如果卵细胞用于制备细胞周期或 CSF 提取物，可将爪蟾置于 1×MMR 中，见单元 12.6）。
4. 在注射 HCG 后大约 16～22h（如果爪蟾保持在 18℃），将爪蟾转移至一干净的储水池中，将卵倒入一个烧杯中并进行分选，清除其中的卵母细胞和坏掉的卵细胞。

   “好”的卵细胞表面应该有均匀、无杂色的色素沉着。在成熟卵细胞黑色素沉积的半球中心可以看到一个针尖大小的白点，这是卵母细胞发育成熟的标志。“坏”的卵细胞像一个膨胀的白色球，两半球之间的边界完全无法分辨。

基本方案 2　用分裂间期卵细胞提取物进行核组装

当精子染色质或者其他的 DNA 模板（如 λDNA）加到处于分裂间期的非洲爪蟾卵提取物中时，提取物中的膜性囊泡便会结合到染色质的表面，并相互融合，继而与核孔成分结合，形成功能性的合成核。这些核结构能够复制自身 DNA，进行大分子运输，也能够出现凋亡时的核碎片（单元 12.8）。

材料（带√项见附录 1）

分裂间期提取物：粗提物（见基本方案 1）或分级分离产物（见备择方案 1）
0.2mol/L 磷酸肌酸（小量分装，－20℃保存）
5mg/ml 肌酸激酶（小量分装，－20℃保存）
0.2mol/L ATP（小量分装，－20℃保存）
精子染色质（见支持方案 2）
√固定液（用于观察核组装）
显微镜载玻片
$18mm^2$ 盖玻片
荧光显微镜

1. 向粗提物或分级分离细胞液中加入磷酸肌酸（使用 0.2mol/L 储存液），终浓度为 20mmol/L；肌酸激酶（使用 5mg/ml 储存液），终浓度为 50μg/ml；ATP（使用 0.2mol/L 储存液），终浓度为 20μmol/L。

   也可以选择使用 20×能量再生混合物。

2. 如果使用分级分离提取物，要将轻膜成分以 1∶10 的比例稀释后加到提取物中。
3. 用移液器反复吹打充分混匀精子染色质后，将其以一定的浓度加到粗提物或分级分离提取物中，上下反复吹打混匀。

   一般情况下，这些反应可在 500μl 微量离心管中进行，反应总体积＜100μl。卵细胞提取物可供 8000～9000 个/μl 的形成。

4. 室温下孵育 1～2h。
5. 用 200μl 大口吸头或去尖端吸头轻轻上下吹打几次，混匀组装反应液。用去尖端吸头等体积吸取组装反应液 4μl，点于显微镜载玻片上。用吸头向样品液中旋转加入 1μl 固定液，缓慢、轻柔地将一张盖玻片（$18mm^2$）盖在样品上，在荧光显微镜下观察细胞核。

   细胞核在形成过程中会产生一系列形态学改变。在粗提物中，经过约 30min，可见新形成的呈椭圆形的小细胞核。DNA 仍然呈凝集状态，当在紫外通道中观察时，细胞核呈浅蓝色（与 Hoechst 结合）。当 DNA 进一步解凝集时，这种蓝色会呈现不均匀性，最终出现暗色的“空隙”。通过观察完整细胞核对高分子质量 FITC-葡聚糖（可在固定液中加入）的排除能力可判断完整核被膜的形成。因为葡聚糖上没有核定位信号，一旦完全封闭的核被膜形成，这个大分子将无法进入细胞核。

支持方案 2　制备去膜精子染色质作为核组装模板

从每只非洲爪蟾可以得到 1×10^7～2×10^7 个精子头部。根据使用需要，在进行卵细胞提取物的细胞核组装时，精子的使用浓度通常为 100～4000 个/μl。

材料（带√项见附录1）

4或5只雄性非洲爪蟾（如Nasco、Xenopus Ⅰ或Xenopus Express）

√0.1%（w/v）三卡因

√提取缓冲液，4℃保存

√含有200mmol/L、2mol/L、2.3mol/L、2.5mol/L蔗糖的提取缓冲液

5mg/ml抑肽酶（Roche Diagnostics），溶于水

5mg/ml亮抑蛋白酶肽（Roche Diagnostics），溶于水

二硫苏糖醇（DTT）

Triton X-100

蔗糖，超级纯

牛血清白蛋白（BSA；组分V）

解剖工具：剪刀和两把尖头镊子

60mm玻璃培养皿

15ml锥形聚丙烯管

台式离心机

低温离心机，Sorvall HB-4旋翼式转头或者相当设备

2.5ml Beckman超净离心管

TL-100台式离心机和TLS-55转子（Beckman）或相当设备

1. 将雄性爪蟾浸到0.1%的三卡因中（或固定在冰水中）使其麻醉，然后使用颈椎脱位法或捣髓法处死，随后剪断脊髓。用剪刀沿爪蟾中线剪开腹部皮肤。
2. 将肝脏推至一边，夹紧位于腹部中间的脂肪，轻轻拉开直至中线两侧露出睾丸（见图12.5.3）。使用镊子或剪刀将其从结缔组织上慢慢切取下来，置于装有4℃提取缓冲液的60mm玻璃培养皿中。
3. 使用两把尖头镊子，将从4或5只爪蟾中取出的睾丸绞碎成小块，然后转移到一个15ml的锥形聚丙烯管中。涡旋剧烈振荡绞碎的睾丸块，用临床用台式离心机室温下离心约200*g*，平缓离心10s使大块组织沉降。
4. 将上清液转移到一个新管中，向沉淀中加入3ml含有200mmol/L蔗糖的提取缓冲液，涡旋振荡1min，室温下，200*g*，短暂离心10s，反复进行2或3次，直到上清液不再浑浊，合并所得上清。
5. 室温下，450*g*，离心混合的上清液50s，使残余的大组织碎片沉降。将上清液转移至15ml离心管中，室温下，2600*g*，离心10min。
6. 取4个2.5ml Beckman超净离心管，各加入0.2ml含有2.5mol/L蔗糖的提取缓冲液，然后再覆盖1.7ml含有2.3mol/L蔗糖的提取缓冲液，制备蔗糖梯度。
7. 将精子重悬于0.8ml含有2mol/L蔗糖的提取缓冲液中，缓慢地将其覆盖在蔗糖梯度溶液的上面（每管0.2ml）。用移液吸头搅动精子与2.3mol/L蔗糖溶液的界面，TL-100台式超速离心机4℃ 93 000*g*，离心蔗糖梯度溶液25min。
8. 吸去含有污染性血红细胞的梯度液上半部液体。将梯度液的下半部液体转移到一个

新管中。用含有200mmol/L蔗糖的提取缓冲液将精子稀释至12ml，用旋翼式转头4℃ 4100g离心10min，使精子沉降。

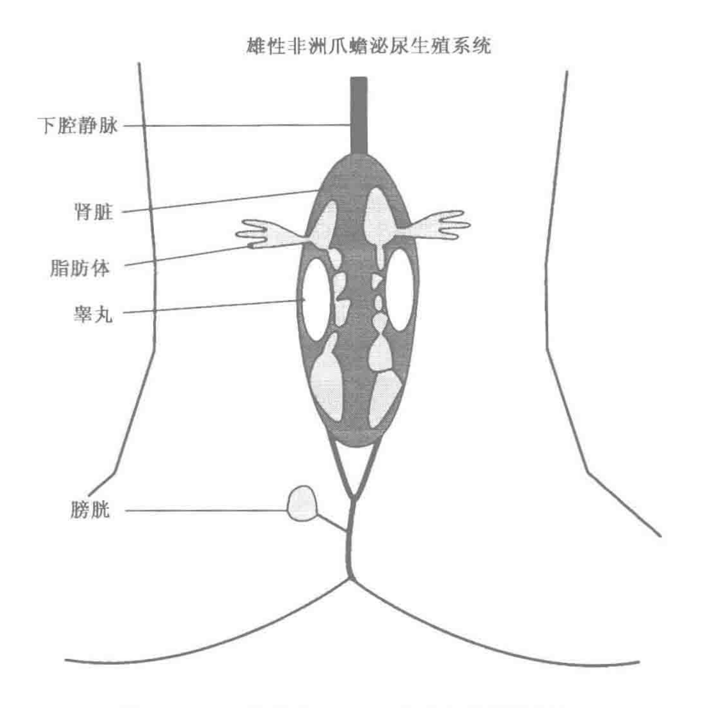


图12.5.3 雄性非洲爪蟾泌尿生殖系统图解
睾丸是位于中线两侧的两个白色的器官

9. 补加提取缓冲液含有以下附加成分：

    200mmol/L蔗糖
    5μg/ml抑肽酶（取自5mg/ml的储存液）
    5μg/ml亮抑蛋白酶肽（取自5mg/ml的储存液）
    1mmol/L DTT
    0.4%（v/v） Triton X-100

   将沉淀重悬于1ml上述补加提取缓冲液/200mmol/L蔗糖中，冰上孵育30min使精子去膜。

10. 在两个1.5ml微量离心管中加入下列成分以制备蔗糖垫：

    0.5ml提取缓冲液
    0.5mol/L蔗糖
    5μg/ml抑肽酶
    5μg/ml亮抑蛋白酶肽
    1mmol/L DTT
    3%（w/v）牛血清白蛋白（BSA；V组分）

   将步骤9中制备的精子置于每个蔗糖垫的上面，使用临床用离心机于室温下，870g离心10min，将精子沉降。

11. 补加提取缓冲液含有以下附加成分：

200mmol/L 蔗糖

3%（w/v）牛血清白蛋白（BSA；V组分）

5μg/ml 抑肽酶（取自 5mg/ml 的储存液）

5μg/ml 亮抑蛋白酶肽（取自 5mg/ml 的储存液）

1mmol/L DTT

从步骤 10 得到的沉淀中去除上清，将沉淀的精子重悬于 0.1ml 上述补加提取缓冲液中，并转移到一个干净的微量离心管中。

12. 将精子染色质沉淀重悬于总体积约 0.25ml 的步骤 11 制备的补加提取缓冲液/200mmol/L 蔗糖中。

13. 用血细胞计数器计数精子，并稀释悬液至浓度为 50 000～100 000 个/μl。小体积等量分装，液氮冷冻，保存于－70℃。

每只爪蟾一般能获得 $1\times10^7\sim2\times10^7$ 个精子。

基本方案 3 体外进行核蛋白输入

材料

分裂间期卵细胞提取物：粗提物（见基本方案 1）或分级分离提取物（见备择方案 1）

ATP-再生系统（见基本方案 2）

非洲爪蟾精子染色质（见支持方案 2）

核输入底物（见单元 12.4，支持方案 2）

固定液 1（见用于观察核蛋白输入的固定液配方）

16%（w/v）多聚甲醛

固定液 2（见用于观察核蛋白输入的固定液配方）

显微镜载玻片

盖玻片

荧光显微镜，配备有：

- 64×物镜（如 Zeiss 64×planapochromat，大孔径）
- CCD 照相机
- 图像采集卡
- 计算机控制图像处理软件（如 NIH Image）

1. 使用精子染色质和分裂间期提取物，通过加入 ATP-再生系统（磷酸激酶、肌酸激酶和 ATP；见基本方案 2，步骤 1 和材料列表），或者加入约 1000 个/μl 其他来源的核提取物（如大鼠的肝细胞核）来进行核组装。室温下孵育 30min。

2. 30min 孵育后，可见核已经形成（见基本方案 2，步骤 5）

不涉及时间过程的方案

3a. 一旦核形成，将核输入底物加到组装反应液中，用移液器小心吹打混匀。室温下孵育 30min，或者更长时间。

加入底物的准确量要根据经验来确定，取决于特定的底物批次和实验的目的。如果是简单的功能测定，应加入终浓度约 5μg/ml（1/200 稀释）的 TRITC 输入底物。如果是为了对输入的时间过程进行定量分析，浓度应该略低，使对分析时间的反应信号保持在线性范围内。

4a. 核与输入底物共同孵育 30min 或更长时间之后，使用固定液 1 份等份固定，以检测底物的输入情况。如果有必要，可将固定样品在 4℃ 暗处保存。

输入过程不同时间点的定量测定

3b. 如上建立一个有足够体积的组装反应，在每个时间点上至少可以取到 5μl 等量的反应液。

4b. 加入输入底物后，立即从反应液中转移 5μl 到置于冰上的微量离心管中。加入 1.5μl 的 16%多聚甲醛（使其终浓度为 3.7%）固定样品（T_0）。用去尖端吸头轻轻混匀。将固定的样品置于 4℃，暗处保存。15～20min 后按照设定的时间点，依上操作继续等量移取反应液并进行固定。

5. 显微镜观察前现制备供观察的标本。在载玻片上等量加 4μl 固定好的样品，再加入 1μl 固定液 2。在样品上小心加盖一张盖玻片。

6. 加盖盖玻片后立即对转运情况进行定量检测，只在无 FITC-葡聚糖的核的位置上画线。

7. 为了定量，使用配备有 64×物镜、CCD 照相机、图像采集卡、计算机控制图像处理软件的显微镜进行观察。一旦确认某一细胞核，即捕获图像并使用鼠标在计算机上勾画出核所在的区域。使用软件测定核内的平均荧光强度以及核面积。核面积乘以平均荧光强度即得总的核荧光强度。

基本方案 4　用连续标记 DNA 方法分析复制过程

材料（带√项见附录 1）

分裂间期提取物（见基本方案 1）
0.2mol/L 磷酸肌酸（小体积等量分装，－20℃保存）
5mg/ml 肌酸激酶（小体积等量分装，－20℃保存）
0.2mol/L ATP（小体积等量分装，－20℃保存）
去膜精子染色质（见支持方案 2）
10μCi/μl [α-^{32}P] dCTP（3000 Ci/mmol）
√复制终止液
10μg/ml 蛋白激酶 K（Worthington）

1. 在间期提取物中加入磷酸肌酸（取自 0.2mol/L 储存液）至终浓度 20mmol/L，肌酸激酶（取自 5mg/ml 储存液）至终浓度 50μg/ml，ATP（取自 0.2mol/L 储存液）至终浓度 2 mmol/L。
2. 为了进行以精子染色质为材料的复制分析，用移液器剧烈吹打去膜的精子染色质，消除聚集的团块，然后直接注入到间期提取物中，至精子头部的终浓度为 100～4000 个/μl 提取物。
3. 将［α-^{32}P］dCTP（或放射性标记的其他三种脱氧核苷酸中的一种）以 0.1μCi 1μl 提取液的浓度直接加到提取物中，室温孵育。每 20min 取 10μl 反应液，加到等体积的复制终止液中。取 3μl 10mg/ml 蛋白激酶 K 加到每份液体中，37℃孵育 2h。
4. 1％琼脂糖凝胶中检测样品。
5. 烘干胶，利用放射自显影技术曝光成像，或者使用磷光显像分析仪（单元 7.8）。

   应该呈现两条复制的 DNA 条带。

备择方案 2　用脉冲标记 DNA 方法分析复制过程

附加材料（同见基本方案 4；带√项见附录 1）

√XB 缓冲液

1. 将一份［α-^{32}P］dCTP 稀释到 4 份 XB 缓冲液中，取该混合液 0.5μl（1μCi），置于一个空的微量离心管中，用于每个时间点的检测。此步的目的是使每一种实验条件都被检测（如对照提取物，加有目的蛋白的提取物，或去除目的蛋白的提取物等）。室温下放置。

   上面这些是分析管。为了使用已经重建的分级分离提取物（加入有膜成分的超 S 提取物），应按照以下时间间隔设立分析管：0～30min，30～60min，60～90min，90～120min，120～150min。对于分裂间期粗提物，最好采用更短的时间点：例如，1～15min，15～30min，30～45min，45～60min，60～75min，75～80min。在室温下放置。
2. 配制样品主反应液（见基本方案 4，步骤 1～2）。置于冰上。
3. 开始分析时，将主样品管移至室温，从每个管中取 5μl，加到含有［α-^{32}P］dCTP 的分析管的第一个管中（例如，分级分离提取物的 0～30min 分析管，或粗提物的 0～15min 分析管）。在室温下继续孵育主样品管和分析管。
4. 在特定时间间隔结束时（如 30min 或 15min），加入 5μl 复制终止缓冲液，将样品移至冰中。从每个主样品管中取出 5μl（或更多些）按顺序移至下一个分析管中（如 30～60min 管，15～30min 管）。同样，在下一个特定时间间隔结束时加入复制终止缓冲液终止反应。依此进行直至完成所有的时间间隔点的实验。
5. 用蛋白激酶 K 消化样品，依基本方案 4 中方法进行琼脂糖凝胶电泳检测。

基本方案 5　制备卵母细胞提取物

成熟爪蟾的四期卵母细胞生理性地休止于第一次减数分裂的前期，因此含有非活性

cdc2/cyclinB 复合物。

材料（带√项见附录 1）

成熟雌性非洲爪蟾（如 Nasco、Xenopus Ⅰ或 Xenopus Express）

√0.1%（w/v）三卡因

√含钙和无钙的改良 Barth 液（MB）

1mg/ml 胶原酶 A（Roche Diagnostics），用无钙 MB（见配方）配制

√EB 缓冲液

√1000×CLAP 蛋白酶抑制剂混合液

√1000×（5mg/ml）细胞松弛素 B，用 DMSO 配制

解剖显微镜

解剖刀

尖头镊子

50ml 塑料管

试管旋转混合器

临床用离心机

台式超速离心机，旋翼式转头

1ml 注射器

18 号针头

1. 将成熟雌性爪蟾放置在 1L 0.1%（w/v）三卡因中，直到不动为止，一般需要 30～60min。
2. 将爪蟾腹面朝上放在冰床上。先用去离子水，然后用乙醇擦涂腹面。用乙醇清洁和消毒所有的器械。
3. 在腹部垂直、稍偏离中心的位置切一个约 1cm 的小切口。切透皮肤和肌肉层。轻轻将卵母细胞挑出腹腔，用解剖刀或剪刀切取，放在盛有无钙 MB 的培养皿中。

   事先在培养皿表面涂敷 6%多聚-HEMA 的乙醇液（将 polysciences 的 12%的多聚-HEMA用乙醇稀释成 6%），这样可以防止卵母细胞吸附在塑料培养皿上。简单地将多聚-HEMA 溶液倒入培养皿中以涂敷表面，然后倒净液体，在通风橱中干燥。这些带盖培养皿可以在室温下保存。
4. 将卵巢（卵母细胞团）撕碎成含有约 50 个卵母细胞的团块。不准备马上使用的卵母细胞置于含钙 MB 溶液中，18℃保存。
5. 将约 10ml 卵母细胞加到装有 30ml 胶原酶 A 溶液的 50ml 塑料管中，放在试管旋转混合器上。在解剖显微镜下定时检查卵母细胞，直至大部分从滤泡细胞上脱落下来，转移胶原酶并于－20℃保存。
6. 用无钙 MB 溶液充分漂洗卵母细胞。向含有卵母细胞的 50ml 塑料管中加满缓冲液，静止几秒钟，使较大的、发育完全的卵母细胞沉降下来，然后使用大口移液吸头吸去含有较小的、未成熟卵母细胞的上层缓冲液。重复上述过程 5 次，以去除胶原酶，选出成熟的卵母细胞。

7. 漂洗后，将卵母细胞置于培养皿中，解剖显微镜下筛查。去除任何看起来不健康的（裂解的或有斑纹的）、不成熟的或者出现胚泡破裂（GVBD）的卵母细胞。

   如果卵母细胞出现 GVBD，在细胞黑色半球顶部的中心会出现一个白点。如果卵母细胞不准备马上用于提取物的制备，在加有含钙 MB 液的培养皿中，18℃下可保存 2 天。

8. 用大口巴斯德玻璃吸管（即将吸管尖口端的大部分截去，将吸耳球放在该端吸取液体）将卵母细胞小心移至一个 50ml 锥形管中，采用步骤 6 中的方法用 EB 缓冲液漂洗两次。
9. 制备 10ml 含有蛋白酶抑制剂混合液 CLAP 的 EB 溶液（用储存液 1∶1000 稀释）。采用步骤 6 中的方法用 EB/CLAP 漂洗卵母细胞。
10. 将卵母细胞转移到供台式超速离心转头使用的 2.5ml 薄壁同质异晶聚合物离心管中（如 TL-100 的 Beckman TLS-55 转头）。将加满的小离心管放到一个 15ml 的离心管中，使用临床用离心机 400g，离心 30s，使卵母细胞沉降。尽量去除卵母细胞表面的缓冲液，以防止提取物最终被稀释。
11. 使用 TL-100 超速离心机（或相当设备），Beckman TLS-55 SW Ti 转头，15 000g 4℃ 离心 15min，裂解卵母细胞。

    离心后，会出现 3 个层面：黑/绿色底层（含有卵黄小板、线粒体等），乳状中间层（含卵母细胞提取物），黄色顶层（含脂类）。卵母细胞提取物是细胞液和膜成分的混合物。

12. 使用带有 18 号针头的 1ml 注射器，在卵母细胞层的基部（乳状中间层），从侧面刺穿离心管。将该层吸出并转移到第二个薄壁离心管中。加入 1000×细胞松弛素 B 至提取液中终浓度为 50μg/ml（即 1∶1000 稀释储备液）。如步骤 11 进行离心。
13. 将步骤 12 中的中间提取物层转移至一个微量离心管中，去除沉淀物。将该提取物以 100μl 等量分装到微量离心管中，液氮冷冻，于－80℃保存。

支持方案 3　免疫去除方法去除提取物蛋白质

通过免疫去除从卵提取物中完全去除蛋白质，通常需要使用高亲和力的抗体进行多轮次的去除才能实现。首先要考虑的因素是去除步骤本身可能对正在研究的过程产生人为的干扰。因此，采用免疫前或者 IgG 缺失提取物作对照就非常重要。而且，在去除过程中避免提取物的过度稀释也是很重要的，因为这有可能会损害到提取物功能的行使。

材料（带√项见附录 1）

抗体/抗血清
免疫前血清或对照 IgG
蛋白 A-Sepharose
√磷酸钠盐缓冲液（PBS）
牛血清白蛋白（BSA，组分 V）

√XB 缓冲液

1. 将经过亲和纯化的抗体与蛋白 A-Sepharose（用含 2mg/ml 牛血清白蛋白的 PBS 配制）孵育以制备抗体微珠（单元 8.5）。用同样的方法制备免疫前血清（对照）微珠。在微量离心管中将微珠沉降，弃去所有的液体。
2. 只适用于粗提物或细胞周期提取物：取 100μl 或者更少的准备用于去除蛋白质实验的新鲜提取物，在 4℃快速漂洗微珠。再洗 1 次，弃去所有的液体。
3. 取 100μl 要去除蛋白质的提取物，加到 15μl 压实的抗体微珠中，4℃下旋转混合 40min。微量离心使微珠沉降，将上清液移至装有新的抗体微珠的离心管中，如上步骤冲洗。4℃下旋转混合 40min 并离心。将提取物转移至一个新管中。

支持方案 4 向提取物中加入目的蛋白

材料（带√项见附录 1）

重组目的蛋白
√XB 缓冲液

1. 以 XB 缓冲液透析或微量浓缩目的蛋白。
2. 将目的蛋白以大于 1∶5 的稀释比例加到提取液中，如果可能，采用 1∶10 或更大的稀释比例则更好。

上述提取物可用来研究蛋白质间的相互作用，或者在卵母细胞中发生的特定生物化学反应。

参考文献：Mechali and hHarland，1982；Sheehan et al.，1988
撰稿人：Maureen Powers，Erica K. Evans，Jing Yang，Sally Kornbluth

（方 瑾 译）

单元 12.6 利用非洲爪蟾卵细胞提取物分析细胞周期

能够在体外再现完整受精卵细胞周期的细胞周期提取物，可在间期与分裂期之间转换，从而可再现体内细胞周期各时相的分子事件，包括 DNA 复制、细胞周期蛋白 B（cyclin B）合成与降解、cdc2/cyclin B 活化与失活、核膜解体与重建，以及染色质凝集等。

基本方案 1 制备细胞周期提取物

注意： 制备细胞周期提取物时，传统上应用 Versilube F-50 硅油，但最近试剂公司用 M-20 油取代了它，据称这种试剂与 Versilube F-50 硅油性质相同，但此说法并未得到广泛验证。

材料（带√项见附录 1）

√1×和 0.2×MMR

产于 1×MMR（见配方）中的未受精卵

Versilube F-50/硅油（见基本方案 1，注意事项）

√XB 缓冲液

√CL 蛋白酶抑制剂混合物

√2%（w/v）半胱氨酸

用于 Beckman SW 55 Ti 转头的 5ml 同质异晶聚合物离心管

活化槽（见图 12.6.1）

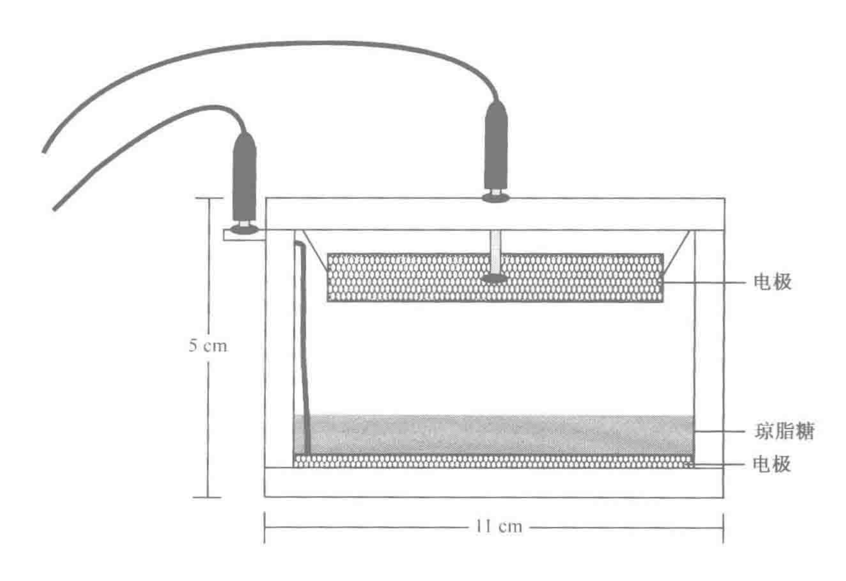


图 12.6.1 活化槽。活化槽由树脂玻璃制成，底边长为 11cm，高为 5cm。槽的底部和盖子的内面覆盖有不锈钢盘状电极，槽底部覆盖有一层溶于 0.2×MMR 缓冲液的 0.2%（w/v）琼脂糖。将卵和 0.2×MMR 缓冲液倒在槽底部的琼脂糖上，电极通过导线连于一个 12V 的 AC 电源。特别应注意的是，要使缓冲液接触到上面的盘状电极，这才能使电流通过活化槽将卵活化

12V（AC）电源，带有能快速控制电流的肘节开关

大口巴斯德吸管

15ml 离心管

临床用离心机

冰-水浴

Beckman 落地式超速离心机，带有 SW 55 Ti 或与其相当的转头

连接于 5ml 注射器上的 18 号针头

1.5ml 微量离心管，微量离心机（4℃）

1. 注射爪蟾（见单元 12.5，支持方案 1），不同的是在注射后将爪蟾放置于 1×MMR 中，以便卵可产于此溶液内。
2. 次日晨，将卵倒于烧杯中，室温下用蒸馏水洗一次，然后在水中放置 10min。
3. 分别向两支用于 Beckman SW 55 Ti 转头的 5ml 同质异晶聚合物离心管中各加入 Versilube F-50 油 1ml。另取一试管，加入 10ml XB 缓冲液，再加入 CL 蛋白酶抑制剂混合物并使其终浓度为 10μg/ml，分别吸取 3ml 该混合物加入两支含 versilube F-50 油的离心管内。
4. 将卵用 2%半胱氨酸孵育 5min 去掉胶质层，再用 0.2×MMR 洗 3 次。
5. 将 0.2×MMR 倒入活化槽，并使上面的电极能够接触到溶液，再倒入爪蟾卵。接通 12V 的 AC 电源，以"3s 脉冲- 5s 停顿- 3s 脉冲"的方式进行活化。活化开始后，打开计时器倒计时模式，使从活化开始到步骤 7 的全部时间小于 15min。

   成功的活化会使动物极上的色素减少。如果开始时卵暗面在上，那么活化后就会看到来自于植物极的一个亮边包绕在卵的边缘。
6. 将活化后的卵倒于一培养皿中，用 XB 缓冲液洗 3 次。用大口巴斯德吸管将卵轻轻地滴于盛有油和缓冲液的离心管中，尽量避免卵周围的缓冲液稀释了离心管中的缓冲液。将此装有卵的离心管放于 15ml 离心管中，并用临床离心机于室温下以 400*g* 离心 30s，再以 1350*g* 离心 20s。
7. 用巴斯德吸管吸去卵上层多余的缓冲液和油。继续在室温孵育，直到活化开始后 15min，然后再在冰-水浴中孵育 15min。
8. 用 Beckman SW 55 Ti 旋翼式或与其相当的转头，4℃ 12 000*g* 离心 10min，以裂解卵。

   此时，提取物将会分为 3 层，从上向下依次为：脂类、提取物（细胞质和膜）和卵黄。
9. 用连接于 5ml 注射器上的 18 号针头在侧面刺穿离心管，收集提取物层（细胞质和膜）。将提取物置于 1.5ml 微量离心管中，4℃ 12 000*g* 离心 10min，以除去色素颗粒和其他颗粒物质。立即使用该提取物。

基本方案 2　制备被 CSF 抑制的提取物

爪蟾卵含有一种细胞质因子，名为细胞静止因子（CSF），它能够通过稳定有丝分裂调节因子 cyclin B，至少部分地帮助稳定有丝分裂状态。在存在钙螯合剂的条件下制备的提取物有高水平的 CSF 活性和 cyclin B 蛋白。当制备的提取物处于分裂期时，加入钙可导致 CSF 的失活和 cyclin B 的破坏，从而使提取物进入间期。尽管这些提取物之后会像细胞周期提取物（见基本方案 1）那样，在 cyclin 合成时进入下一个有丝分裂期，但它们会停止于下一个有丝分裂期，而不是继续进行周期性转化，这可能是由于残留的、未被完全破坏的 CSF 活性的存在。

材料（带√项见附录 1）

溶于 1×MMR 中的爪蟾卵

√2%（w/v）半胱氨酸
√0.2×MMR
√XB 缓冲液
Versilube F-50/硅油（Andpak-EMA）
√0.5mol/L EGTA 储存液，pH 8.0
√1mol/L $MgCl_2$ 储存液
√CL 蛋白酶抑制剂混合物
2%（w/v）细胞松弛素 B（Calbiochem）
用于 Beckman SW 55 Ti 或与其相当转子的 5ml 同质异晶聚合物离心管
去尖端的光滑的巴斯德吸管
15ml 离心管
临床离心机
落地式高速离心机（如 Sorvall，Beckman）
Beckman SW 55 Ti 旋翼式或与其相当的转子
连接有 18 号针头的 5ml 注射器
聚碳酸酯超净微离心管（Beckman）
微量离心机（4℃）

1. 前述产于 1×MMR 中的爪蟾卵，用 2%半胱氨酸去掉胶质层，再用 0.2×MMR 洗 3 次（见基本方案 1）。

   材料的用量依据所需的提取物的量而定：1ml 卵压紧后约 0.5ml，进一步可得到 0.25ml 提取物。

2. 将卵在 XB 缓冲液中洗 3 次。再将卵在含有 5mmol/L EGTA 和 1mmol/L $MgCl_2$ 的 XB 缓冲液中洗 3 次。
3. 分别向两支用于 Beckman SW 55 Ti 或与其相当转子的 5ml 同质异晶聚合物离心管中加入 1ml Versilube F-50 油。另取一干净试管，先加入 10ml XB，然后加入 EGTA 和 $MgCl_2$，使浓度分别为 5mmol/L 和 1mmol/L，再加入 CL 蛋白酶抑制剂混合物和细胞松弛素 B，使终浓度均为 10μg/ml，分别吸取 3ml 该混合物加入两支含 Versilube F-50 油的离心管内。
4. 用去尖端的光滑的巴斯德吸管将卵滴入含有油和缓冲液的离心管中直到加满。将此装有卵的离心管置于 15ml 离心管中，用临床离心机于室温下以 400g 离心 40s。
5. 用巴斯德吸管吸去多余的缓冲液和全部的油。
6. 在 SW 55 Ti 或与其相当的转子中，4℃ 12 000g 离心 10s，以裂解卵。

   此时，提取物将会被分为 3 层，从上向下依次为：明亮黄色的含脂层、棕色的提取物层（细胞质和膜）和深绿色的含卵黄和色素颗粒层。

7. 用连接于 5ml 注射器上的 18 号针头在离心管穿孔，收集提取物层（中间层，含细胞质和膜）。将提取物置于微量离心管中，4℃ 12 000g 离心 10min。再用注射针头回收提取物层，并置于冰上。

   该提取物可用于有丝分裂重建，或通过向提取物中加入 $CaCl_2$ 使之终浓度在 0.1～

0.4mmol/L，用于间期等实验（见支持方案3）。

基本方案3　制备有丝分裂提取物

为了制备比CSF抑制提取物更为稳定的被阻断于M期的提取物，不但有必要加入钙螯合剂，还要加入常规的磷酸酶抑制剂。

材料（带√项见附录1）

产于100mmol/L NaCl中的爪蟾卵
√2%（w/v）半胱氨酸
√有丝分裂缓冲液
√AL蛋白酶抑制剂混合物
√5mg/ml细胞松弛素B储存液
√加有250mmol/L蔗糖的有丝分裂缓冲液（可选项）
15ml聚碳酸酯超净离心管
临床离心机
落地式高速离心机（如Sorvall，Beckman）
大容量旋翼式转头（如Sorvall HB-4，HB-6）
连接于5ml注射器上的18号针头

1. 收集产于100mmol/L NaCl中的爪蟾卵，用2%半胱氨酸去除胶质层，清洗并分类（见单元12.5，基本方案1）。
2. 去除胶质层后，用有丝分裂缓冲液洗3次。将卵倒入15ml聚碳酸酯超净离心管中。用临床离心机于室温下以400*g*离心20s，再以1350*g*离心20s，收集卵。用巴斯德吸管吸出多余的缓冲液。
3. 加入AL蛋白酶抑制剂混合物到5μg/ml，加入5mg/ml细胞松弛素B储存液到5μg/ml。4℃ 12 000*g*离心10min。
4. 用连于5ml注射器上的18号针头在离心管穿孔，收集棕色的含有细胞质和膜的提取物层。
5. 可选项：应用制备分级分离间期提取物的方法（见单元12.5，备择方案1），进一步将上面所述的有丝分裂的粗提物分离为细胞质组分和膜组分。在此实验中，用加有250mmol/L蔗糖的有丝分裂缓冲液制备蔗糖垫以分离膜组分。

   该提取物为有丝分裂囊泡膜的优质来源。

基本方案4　使间期提取物进入有丝分裂

由于加入放线菌素可抑制进入有丝分裂所需的细胞周期蛋白的合成，因此间期卵提取物不会自然进入有丝分裂。为了使这些提取物进入有丝分裂，可以加入有丝分裂细胞周期蛋白（如cyclin B）的重组体，它能与有丝分裂蛋白激酶cdc2相作用并将其激活。

因为有丝分裂细胞周期蛋白在被 cdc2 活化后会降解，如果提取物要永久地处于有丝分裂时期，必须使用缺少泛素化信号（降解框）的细胞周期蛋白突变体（Murray et al. 1989）。另一个使核在组装后进入有丝分裂的方法是用有丝分裂提取物以 1∶1 的比例稀释提取物（见基本方案 3），由此可提供活性 cdc2/cyclin 复合物，催化核的去组装。

材料

含有新生核的间期提取物（粗提物或分级分离间期提取物）（单元 12.5）
重组细胞周期蛋白（Desai et al. 1995）

1. 待粗提物或分级分离间期提取物合成核后，加入重组细胞周期蛋白（15～20nmol/L，由细菌或杆状病毒产生），在室温孵育 30～60min。
2. 用观察核组装同样的方法（单元 12.5），观察核的去组装。

本实验中核被膜将裂解：相差显微镜下可观察到暗环消失，同时核的 FITC-dextran 核排除能力及 DHCC 结合能力消失。更令人惊奇的是，染色质凝集成分散的团块。尽管延长孵育时间可以使分离的染色体更易观察，但一般来说用 Hoechst 33258 染色的有丝分裂 DNA 看起来像一个缠在一起的通心粉块。

尽管核的形态学变化是进入有丝分裂的很好标志，但也可以通过检测加入的细胞周期蛋白的活性来判断是否进入有丝分裂，检测的方法是以 H1 作为一种外源性底物，检测结合在细胞周期蛋白上的 cdc2 的激酶活性从而确定细胞周期蛋白的活性（见支持方案 2）。

备择方案　在体外生成复制检验点

细胞在完成复制前是不会进入有丝分裂的。为了防止进入有丝分裂，细胞周期检验点监测 DNA 复制的状态并防止 DNA 在复制完成前进入有丝分裂。

材料（带√项见附录 1）

精子染色质（单元 12.5）
√20×能量再生混合液
细胞周期提取物（见基本方案 1）
√溶于高纯度 DMSO（如 Pierce）中的 5mg/ml 阿非迪霉素（aphidicoliu）储存液（Sigma）

1. 向大约 50μl 的细胞周期提取物中加入 20×能量再生混合液使其终浓度达到 1×，加入精子染色质达到终浓度 500 个核/μl 提取物，再加入 50μg/ml 阿非迪霉素，充分混合。在室温孵育并监测细胞周期状态（见支持方案 1）。

阿非迪霉素是一种能抑制精子染色质复制的 DNA 聚合酶抑制剂，因此能将细胞周期阻滞于有丝分裂前。为了确定未进入有丝分裂是由于 DNA 复制检验点所致，可以向提取物中加入咖啡因，它可以跃过检验点使提取物进入有丝分裂。加入溶于水

的 0.5mol/L 咖啡因储存液。制备这种储存液时，应将混合物煮沸，因为咖啡因只有在沸腾的情况下才能在此浓度溶入溶液。

支持方案 1　监测提取物的细胞周期状态

监测提取物是否进入有丝分裂，可以通过以下几种方法：①观察核的形态；②生化检测 cdc2/cyclin 激酶活性或磷酸化水平；③直接检测 DNA 复制（单元 12.5）。

材料（带√项见附录 1）

细胞周期提取物
精子染色质（单元 12.5）
√20×能量再生混合液

1. 为了观察整个细胞周期中核的形态，将精子染色质加到提取物中（500 个核/μl），再加入 1∶20 稀释的 20×能量再生混合液。反复吹打以充分混合提取物，在室温孵育。每 10min 间隔取样 1 次，在荧光显微镜下观察（单元 12.5，基本方案 2）。

   从间期向有丝分裂期转换应发生于室温孵育后的 60～120min。
2. 使用组蛋白 H1 作为 cdc2/cyclin B 的外源性底物（见支持方案 2）。通常以 10min 为间隔取样，并迅速在液氮中冻存，以备组蛋白 H1 激酶活性检测。

   组蛋白 H1 激酶活性的峰值多出现在观察到染色质凝集或核膜崩解的 10min 前。组蛋白 H1 激酶活性的变化甚至可以发生在无精子染色质（或任何其他来源的 DNA）的提取物中。

   另一种检测提取物的细胞周期状态的方法，是检测 cdc2 中苏氨酸的磷酸化水平。cdc2 的磷酸化发生在其两个负性调节位点 Thr14 和 Thr15，在间期时这两个位点的磷酸化水平高，在进入分裂期后由于 cdc25 将 cdc2 去磷酸化而明显降低。因此，以 10min 为间隔取得的提取物样品能够用 SDS-PAGE 分离（单元 7.7），并用抗磷酸化苏氨酸抗体进行免疫印迹。

支持方案 2　检测组蛋白 H1 激酶活性

材料（带√项见附录 1）

提取物：细胞周期提取物（见基本方案 1）或进入有丝分裂的间期提取物（见基本方案 4）
√EB 缓冲液
液氮
√10×激酶缓冲液
1mg/ml 组蛋白 H1（Roche Diagnostics）
500μmol/L 蛋白激酶抑制肽（PKI；Sigma）
0.2mol/L ATP

5mCi/ml [γ-^{32}P] ATP (3000Ci/mmol)

√2×SDS 上样缓冲液

1. 用 EB 缓冲液以 1∶1 的比例稀释提取物（如 2μl EB 缓冲液加入 2μl 提取物中），迅速置于液氮中冷冻，不经融化直接分装保存于－80℃。
2. 如下制备足够量的激酶混合液，每份激酶反应 10μl（如每份要检测的提取物样品）。首先配制一个主混合液，即按照反应份数加 1 的量（考虑移液误差）将下列配方加倍。

   1μl 10×激酶缓冲液
   1μl 1mg/ml 组蛋白 H1
   0.4μl 500μmol/L PKI
   4～8μCi [γ-^{32}P] ATP
   加水至 10μl
3. 对于每份检测样品，先向一个新的微量离心管中加入 10μl 激酶混合液。
4. 将要检测的样品从－80℃直接转移到装有粉碎干冰的容器内。
5. 向第一个要检测的样品中（含有 2μl 提取物和 2μl EB 缓冲液）加入 240μl EB 缓冲液，并迅速上下吹打。样品融化后，立即将 10μl 混合液加到相对应的含有 10μl 激酶混合液的管中，并开始用计时器计时。
6. 10min 后加入 20μl 标准的 2×SDS 上样缓冲液终止反应。将样品冻存或直接在 11%SDS-聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳（单元 7.1）。在染料前沿到达底部前停止电泳。

   放射自显影后，组蛋白是一对非常接近的被放射性标记的条带。

支持方案 3　使被 CSF 抑制的提取物进入间期

为了检测在提取物中去除或加入特殊成分是否会对其移出有丝分裂产生特殊作用，最简单的方法是用能以可控方式从有丝分裂进入间期的 CSF 提取物。

材料（带√项见附录 1）

CSF 抑制提取物

√20×能量再生混合液（见配方）

精子染色质（单元 12.5）

1mol/L $CaCl_2$

√用于观察核组装的固定剂

放线菌素（可选项）

1. 将 20×能量再生混合液加到 CSF 抑制提取物中，使终浓度为 1×。
2. 加入精子染色质，使核的终浓度 100～500 个/μl 提取物。
3. 确定使提取物进入有丝分裂的 $CaCl_2$ 最小浓度。取含有能量再生混合液和精子染色

质的提取物，小量分装后加入 1mol/L $CaCl_2$，使 $CaCl_2$ 浓度达到 0.1mmol/L、0.2mmol/L 或 0.4mmol/L、在室温下孵育。

4. 以 10min 为间隔，取 4μl 样品，加入 1μl Hoechst 33258 染 DNA。用荧光显微镜观察。确定可使 CSF 抑制提取物有效进入间期的最低 $CaCl_2$ 浓度。

   在适当的浓度，精子染色质将去凝集形成膜封闭核（单元 12.5）。

5. 可选项：为了使加入钙剂后的提取物停止于间期，加入放线菌素，其终浓度在加入钙剂后达 50μg/ml。

   CSF 抑制粗提物能进一步分离为细胞质和膜成分（见单元 12.5，备择方案），储存于－80℃。CSF 提取物的冻/融细胞质组分完全能支持染色质凝集和纺锤体形成。

参考文献：Dasso and Newport，1990；Desai et al.，1995

撰稿人：Sally Kornbluth，Jing Yang and Maureen Powers

单元 12.7　有丝分裂纺锤体的体外组装

基本方案 1　分析 DMSO 和中心体的星体反应

星体反应是一种测定提取物能否进行微管成核、聚合和组装的简单快捷方法。

材料（带√项见附录 1）

20～30 mg/ml 罗丹明标记的微管蛋白（见支持方案 2）
CSF 提取物（见支持方案 1；单元 12.6）
无水二甲基亚砜（DMSO），或浓度约为 5×10^8 个/ml 的纯化中心体
√纺锤体固定剂
指甲油
1.5 ml 微量离心管
1～200μl 大口吸头
水浴
显微镜载玻片和 18mm×18mm 正方形盖玻片
荧光显微镜，40×或 63×物镜及罗丹明/Hoechst 滤光片组

1. 冰上将 1μl 罗丹明标记的微管蛋白储存液加到 10μl CSF 提取物中（1∶10 稀释）。冰上制备反应管：取 1∶10 稀释的微管蛋白溶液 1.25μl，加到置于 1.5ml 微量离心管中的 25μl CSF 提取物（1∶20 稀释）中，使最终反应混合液中的微管蛋白浓度为 1∶200稀释。

   重要警告：混合、转移提取物及进行提取物反应时均应使用大口（或去尖端）吸头，要避免产生气泡。应使用 1.5ml 微量离心管，且反应物体积不要超过 100μl，以保证充分的气体交换。

   如果要进行多个反应，应将标记微管储存液以 0.10～0.15mg/ml（1∶200）的终浓度稀释到所需要的提取物总体积中，然后以 25μl 分装。

2. 加入 1.25μl 无水 DMSO 或浓度约为 5×10^8 个/ml 的纯化中心体。
3. 向室温的水浴中加冰制备 20℃的水浴，并持续加冰以维持温度。

   重要警告： 样品放到 20℃水浴后反应开始。固定前不要将样品在放到冰上，因为这样会使微管解聚。

4a. 中心体反应：孵育 5～15min 后，将 1μl 反应液滴在显微镜载玻片上制作“压片样品”，小心将 5μl 纺锤体固定剂加在提取物微滴的上面，用 18mm×18mm 盖玻片轻轻盖在载玻片上制作压片。

4b. DMSO 反应：孵育 5～30min 后，将 1μl 反应液滴在显微镜载玻片上，如上述步骤制作压片。

5. 用指甲油封闭盖玻片边缘，于 4℃暗置保存。
6. 用荧光显微镜（40×或 63×物镜）和罗丹明/Hoechst 滤光片组进行分析。

基本方案 2　分析精子 DNA“半纺锤体”反应

“半纺锤体”反应是检测提取物中纺锤体组装一种简单快速的方法。这种纺锤体组装方法是以非生理学方式进行的。

材料（带√项见附录 1）

20～30mg/ml 罗丹明标记微管蛋白储存液（Murray 1991）
CSF 提取物（见支持方案 1；单元 12.6）
20×去膜精子细胞核（浓度约为每微升提取物中含 100 个精子；单元 10.10）
√纺锤体固定剂
指甲油
1.5 ml 微量离心管
水浴
显微镜载玻片和 18mm×18mm 正方形盖玻片
荧光显微镜，40×或 63×物镜及罗丹明/Hoechst 滤光片组

1. 冰上将 1μl 罗丹明标记的微管蛋白储存液加到 10μl CSF 提取物中（1∶10 稀释）。冰上制备反应管：取 1∶10 稀释的微管蛋白溶液 1.25μl，加到置于 1.5ml 微量离心管中的 25μl CSF 提取物（1∶20 稀释）中，使最终反应混合液中的微管蛋白浓度为 1∶200稀释。

   重要警告： 混合、转移提取物及进行提取物反应时均应使用大口（或去尖端）吸头，要避免产生气泡。应使用 1.5ml 微量离心管，且反应物体积不要超过 100μl，以保证充分的气体交换。

2. 加入 20×去膜精子细胞核（浓度约为每微升提取物中含 100 个精子）2.5μl，在 20℃水浴孵育 15min。
3. 将 1μl 反应液滴在显微镜载玻片上，小心将 5μl 纺锤体固定剂加在提取物微滴的上面，用 18mm×18mm 盖玻片轻轻盖在载玻片上制作压片。用荧光显微镜（40×或

63×物镜）和罗丹明/Hoechst 滤光片组进行分析。指甲油封片。

4. 同上方法，分别制备 30min、45min 和 60min 的反应物压片，以检测纺锤体的组装。分析样品，指甲油封片，于 4℃暗处保存。

基本方案 3　分析精子 DNA 周期性反应

此方案是一种检测纺锤体组装过程中间期事件（例如，DNA 复制、中心体复制和染色质包装等）重要性的方法。

材料（带√项见附录 1）

20～30mg/ml 罗丹明标记微管蛋白储存液（见支持方案 2）
CSF 提取物（见支持方案 1；单元 12.6）
20×去膜精子细胞核（浓度约为 100 个/μl 提取物；单元 12.5）
√10×钙溶液
√纺锤体固定剂
20℃水浴
显微镜载玻片和 18mm×18mm 正方形盖玻片
荧光显微镜，40×或 63×物镜及罗丹明/Hoechst 滤光片组

1. 冰上将 1μl 罗丹明标记的微管蛋白储存液加到 10μl CSF 提取物中（1∶10 稀释）。冰上制备反应管：取 1∶10 稀释的微管蛋白溶液 1.25μl，加到置于 1.5ml 微量离心管中的 25μl CSF 提取物（1∶20 稀释）中，使最终反应混合液中的微管蛋白浓度为 1∶200稀释。

   重要提示：混合、转移提取物及进行提取物反应时均应使用大口（或去尖端）吸头，要避免产生气泡。应使用 1.5ml 微量离心管，且反应物体积不要超过 100μl，以保证充分的气体交换。

2. 加入 20×去膜精子细胞核（浓度约为 100 个 1ml 提取物）2.5μl，在 20℃水浴孵育 15min。
3. 加入 10×钙溶液 5μl，充分混合，使提取物进入间期。20℃水浴孵育 80min。
4. 将 1μl 反应液滴在显微镜载玻片上，小心将 5μl 纺锤体固定剂加在提取物微滴的上面，用 18mm×18mm 盖玻片轻轻盖在载玻片上制作压片。加入钙剂后 30min 和 80min，可观察到提取物正在进入间期。用荧光显微镜（40×或 63×物镜）和罗丹明/Hoechst 滤光片组进行分析。

   如果精子核在加入钙剂 30min 后没有发生去凝集，应再加入 10×钙溶液（1∶20 稀释）2.5μl。

5. 加入钙剂后 90min，再加入 0.5 倍体积（25μl）的新鲜 CSF 提取物，继续孵育 20min。

   加入新鲜的 CSF 提取物，会使反应物回到有丝分裂期。

6. 在加入新鲜 CSF 提取物后 15、30、45、60 和 90min 后制备标本以检测纺锤体的组

装。40×和 63×镜头的荧光显微镜和罗丹明/Hoechst 滤光片组进行分析。

7. 指甲油封片，于 4℃暗置保存。

基本方案 4 分析 DNA 磁珠反应

此方案可以检测在没有中心体或特殊的染色体序列存在时，提取物在染色质周围进行纺锤体组装的能力。

材料（带√项见附录 1）

DNA 磁珠（见支持方案 5）

CSF 提取物（见支持方案 1；单元 12.6），有或无 1：200 罗丹明标记微管蛋白（支持方案 2）

√10×钙溶液

√纺锤体固定剂

0.5 ml 微量离心管

磁珠浓缩仪（MPC；Dynal）

水浴

显微镜载玻片和 18mm×18mm 正方形盖玻片

荧光显微镜，40×或 63×物镜及罗丹明/Hoechst 滤光片组

1. 将 DNA 磁珠（约 0.5μg DNA）3μl 加到 0.5ml 微量离心管中，放入置于冰上的磁珠浓缩仪（MPC）内。吸去上清，注意不要扰动沉淀。将磁珠重悬于 20μl CSF 提取物中漂洗。
2. 用磁珠浓缩仪（MPC）回收 DNA 磁珠，吸去上清，将磁珠重悬于 100μl CSF 提取物中，转移到 1.5ml 微量离心管中，20℃水浴孵育 10min。
3. 加入 10×钙剂 10μl，使 CSF 提取物进入间期。20℃水浴孵育 2h，每隔 20～30min 搅拌混合 1 次。
4. 加入 50μl 新鲜的 CSF 提取物使含有 DNA 磁珠的提取物回到有丝分裂期。20℃水浴孵育 30min。
5. 在冰上孵育 DNA 磁珠混合物几分钟，再放入置于冰上的磁珠浓缩仪内 10～15min，回收 DNA 磁珠。
6. 吸去上清。用 100μl 新鲜 CSF 提取物（含 1：200 稀释的罗丹明标记微管）重悬 DNA 磁珠，20℃水浴孵育。

   纺锤体组装需 30～90min，主要取决于提取物。

7. 将 1μl 反应液滴在显微镜载玻片上，制作监测纺锤体组装过程的压片标本。小心将 5μl 纺锤体固定剂加在提取物微滴的上面，用 18mm×18mm 盖玻片轻轻盖在载玻片上制作压片。用荧光显微镜（40×或 63×物镜）和罗丹明/Hoechst 滤光片组进行分析。
8. 指甲油封片，于 4℃暗置保存。

支持方案1 制备CSF提取物

材料（带√项见附录1）

去胶质层的爪蟾卵（单元12.5）
√提取缓冲液（XB）
√CSF-XB
√10mg/ml LPC
10mg/ml溶于DMSO的细胞松弛素D，分装储存于－20℃。
√20×能量再生混合液
400ml烧杯
去尖端的光滑的玻璃吸管
SW-50离心管（Beckman）
13ml转接器（Sarstedt）
临床离心机
Sorvall离心机，适合15ml离心管的带有橡胶套的HB-4或HB-6转头
18号针头和1ml注射器

1. 注射爪蟾，用400ml烧杯收集卵，去胶质层（单元12.5）。
2. 先将去胶质层的卵用50～100ml提取缓冲液（XB）冲洗几次，再用50～100ml的CSF-XB（含5mmol/L EGTA和1mmol/L $MgCl_2$的XB）洗两次。洗时轻轻晃动烧瓶，并在两次洗卵之间尽量多地倒出洗液。用含有10μg/ml LPC的50ml CSF-XB最后洗一次。
3. 用一个经CSF-XB洗过的去尖端的光滑玻璃吸管吸取卵放入装有1ml CSF-XB（含10μg/ml的LPC）的SW-50离心管中，此管中已加入了10mg/ml的细胞松弛素D 10μl（终浓度为100μg/ml）。
4. 将装有卵的SW-50离心管转移到含有0.5ml水的13ml转接器中，以免离心管碎裂。用临床离心机于室温以150*g*离心1min，然后以700*g*离心300s。用去尖端的玻璃吸管从沉淀的卵的上面吸去所有缓冲液。
5. 将离心管置于带有橡胶转接器的HB-4或HB-6转头中，16℃ 16 460*g*离心15min，使卵破裂。
6. 将离心管置于冰上。用连于1ml注射器的18号针头在黄色细胞质层的底部刺穿试管，收集细胞质层。收集一些恰好位于细胞质下面的浅灰色层，但要避免细胞质上面的浅灰色层。
7. 将细胞质中的10mg/ml LPC稀释至1∶1000，10mg/ml细胞松弛素D稀释至1∶500，20×能量混合液稀释至1×。

   如果要使提取物进入间期循环，应从20×能量混合液中除去EGTA。提取物在使用前可在冰上保持6h。

支持方案2　制备罗丹明标记微管蛋白

此方案需要100mg纯化的微管蛋白，最终可得到约20mg的罗丹明标记微管蛋白。

材料（带√项见附录1）

100～200mg用磷酸纤维素柱纯化的微管蛋白，冷冻（Ashford et al. 1998）
√20×转换缓冲液，冰冷
200mmol/L GTP
甘油，37℃
√标记垫
√标记缓冲液，37℃
四甲基罗丹明琥珀酸酯（Molecular Probes）
无水DMSO（二甲基亚砜）（Sigma）
√BRB80垫，37℃
√淬灭缓冲液，37℃
√IB，冰冷
2×和1×BRB80，冰冷（见5×的配方）
37℃水浴
超速离心机，Ti 50转头，聚碳酸酯带螺帽离心管，预热至35℃（Beckman）
3ml宽口塑料移液管
装有H_2O的洗瓶
装配有TLA 100.3转头、TL 100转头、聚碳酸酯离心管的TLA100台式超速离心机，35℃预热（Beckman）
超声粉碎机

1. 取≥100mg的经磷酸纤维素柱纯化的微管蛋白分装液，在37℃水浴中迅速解冻至大部分溶为液体。移至冰上，在刻度量筒中测量体积。
2. 加入1/20体积预冷的20×转换液将柱缓冲液转换为BRB80，加入200mmol/L GTP至终浓度1mmol/L，再加入0.5倍体积的37℃甘油，混匀并用封口膜封口。立即放入37℃水浴，孵育45min使微管蛋白聚合，间隔混合。
3. 进行孵育时，向Ti 50转头配备的聚碳酸酯带螺旋盖离心管中加入5ml标记垫。与Ti 50转头一起预热至37℃。
4. 用3ml宽口塑料移液管将5ml聚合的微管蛋白加到标记垫的上面，35℃ 242 000g超速离心1h。
5. 离心后，将离心管保持于37℃。吸出标记垫以上液体。用洗瓶中的水轻轻地注满每个离心管以清洗交界面，然后吸出清洗液和标记垫。
6. 在37℃，用最小体积的标记缓冲液（每个离心管50μl）重悬沉淀，用去尖端吸头上下吹打，并保持在37℃。用100μl置于37℃的标记缓冲液清洗离心管以回收残留的

微管蛋白。合并所有的重悬液和洗液。注意总体积应约为 1.5ml。

7. 用无水 DMSO 配制 100mmol/L 四甲基罗丹明琥珀酸酯。将 1/10 体积 100mmol/L 四甲基罗丹明琥珀酸酯加到重悬的微管中，轻轻涡旋振荡。37℃孵育 45min，每几分钟涡旋振荡一次。
8. 向 TLA 100.3 转头配备的聚碳酸酯离心管中加入 1.5ml 37℃的 BRB80 垫。
9. 加入保存于 37℃的 2 倍体积淬灭缓冲液以终止标记反应（步骤 7）。充分混合反应液并保持在 37℃。
10. 用 3ml 宽口塑料移液管将混合液加到预热的 BRB80 垫上。用 TLA 100.3 转头以 265 070*g* 超速离心 30min。离心后，开始将离心机冷却至 4℃。
11. 吸出上清，如步骤 5 清洗交界面。将转头和离心管均置于冰上。
12. 将每一沉淀重悬于 100μl 预冷的 IB 中，使微管解聚。收集重悬液，并用吸管上下吹打以打散微管蛋白沉淀。将混合液在冰上孵育 15min。
13. 加 1 倍体积预冷的 2×BRB80，短暂超声。用 Bradford 法（附录 3B）检测微管蛋白的浓度。如果超过 30mg/ml，在进行下一步骤前用 1×BRB80 将微管蛋白稀释至 25mg/ml。
14. 将解聚的微管蛋白加到置于冰上的 TLA 100.3 转头离心管中，4℃ 265 070*g* 离心 15min。离心后，开始将离心机升温至 35℃。
15. 收集上清，并转移到 15ml 锥形管中。加 0.5 倍体积 37℃的甘油，并加 GTP 至 1mmol/L。收集上清后，开始将转头升至 37℃。37℃孵育 45min 使微管聚合，孵育过程中不时地混合。
16. 进行温育时，另将 1.5ml BRB80 垫加至 TLA 100.3 转头离心管中并开始升温至 37℃。
17. 用宽口吸头（即 200～1000μl 去尖端吸头）将聚合的微管加至预热的垫上。35℃ 265 070*g* 离心 20min。离心后，开始将离心机降温至 4℃。同时也将 TLA 100 转头和聚碳酸酯离心管的温度降至 4℃。
18. 弃去上清，将各沉淀重悬于 100μl 预冷的 IB。加入 1 倍体积预冷的 2×BRB80，短暂超声。用 Bradford 法（附录 3B）检测微管蛋白的浓度。如果需要，用预冷的 1×BRB80 将标记的微管蛋白稀释至 30mg/ml。
19. 将混合液加到置于冰上的 TLA 100 离心管中，4℃ 265 070*g* 离心 15min。
20. 在冰上回收上清，用 Bradford 分析法（附录 3B）测定微管蛋白的浓度并记录。以 1μl 和 50μl 等量分装，液氮冷冻，－80℃储存。

支持方案 3 马达蛋白的破坏

此方案给出如何破坏基于微管的马达蛋白-胞质动力蛋白的方法，该蛋白质参与纺锤体极的组织形成。

材料（带√项见附录 1）

动力蛋白中间链抗体 70.1（Sigma），如腹水

无反应活性抗体（如鼠 IgG 或腹水；Sigma）
√提取缓冲液（XB）
12 000～14 000 MWCO 透析袋
4℃微量离心机
低容量浓缩器，截留 mol. wt. 50 000 物质（Microcon）

1. 用 12～14kDa MWCO 透析袋，在 4℃，以总量 1L 的 XB 透析 0.5ml 的 70.1 腹水，更换透析液两次，每次 4h。于 4℃ 用置于微量离心机中的微量浓缩器将其浓缩至 15～20mg/ml。
2. 将 1.25μl 稀释的罗丹明标记微管蛋白和 2.5μl 动力蛋白中间链抗体 70.1 加到 25μl CSF 提取物中（1∶10 稀释）。充分混合，冰上孵育 10～20min。在对照样品中加入等量的对照抗体，如鼠 IgG，进行平行实验。
3. 按照星体或纺锤体组装的方案操作（见基本方案 1～4）。
4. 在不同时间点分析压片或甩片样品，观察比较抗体处理样品和对照样品间的差异。

支持方案 4　甩片反应*

甩片法可使整个反应混合物转移到玻璃盖片上，固定，如果需要，还可在免疫染色技术中使用。

注意：当此方案应用于任何一种星体反应（见基本方案 1 或 2）时，应用 15%的甩片稀释缓冲液和 25%的甩片垫代替此处所述的 30%的甩片稀释缓冲液和 40%的甩片垫。

附加材料（见基本方案 1；带√项见附录 1）

提取物反应液
√30%或 15%的甩片稀释缓冲液
√40%或 25%的甩片垫
甲醇，－20℃
冲洗缓冲液：灭菌的 PBS/0.1%（v/v）NP40
灭菌的 PBS/3%（w/v）BSA
溶于灭菌 PBS 中的一抗和二抗/3%（w/v）BSA（例如，GTU88 抗 γ-管蛋白抗体和 FITC 偶联的羊抗鼠抗体；Sigma）
10mg/ml Hoechst 染料，水配制
√封固剂
1.5ml 微量离心管
装有 12mm 圆形盖玻片的 15ml Corex 管（Aladin Enterprises；见图 12.7.1）
宽口（200～1000μl）吸头

* spin-downs 暂无定名，也可译为甩降式反应。

Sorvall 离心机，HB-4、HB-6 或 HS-4 转头，橡皮转换器
金属钩或微型刮铲
Watchmaker's 镊子
陶瓷染色架
玻璃染色盘
孵育槽：在直径为 150cm 圆形带盖塑料组织培养皿底部铺一层与之大小相同的封口膜

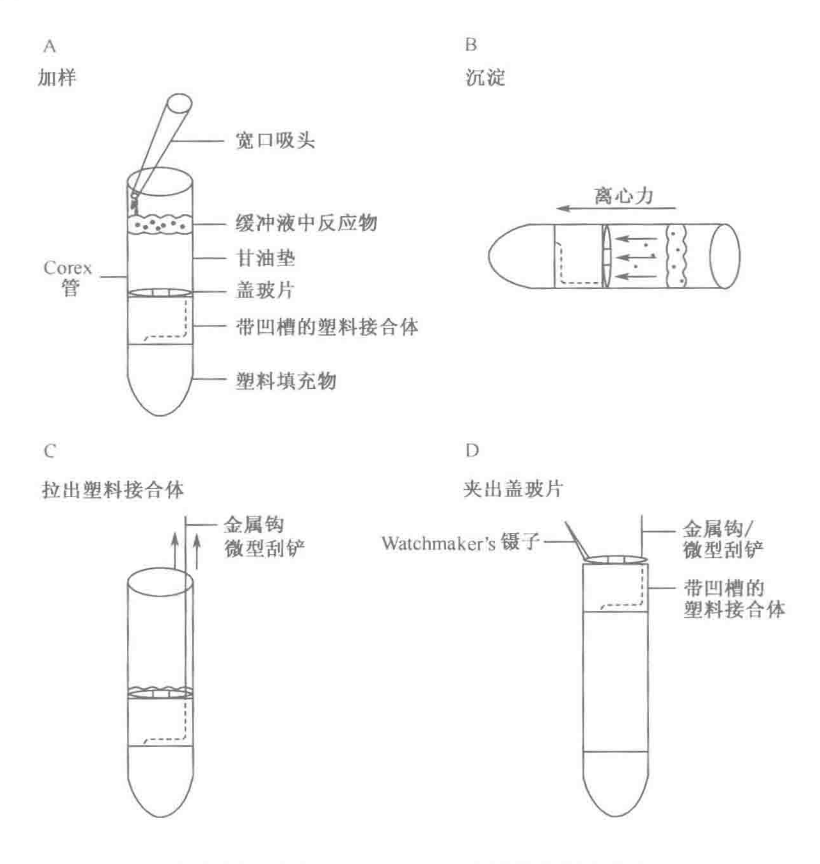


图 12.7.1　如何用甩片离心管将纺锤体或星体从提取物中转移到盖玻片上，以用于免疫荧光检测和长期保存

(A) 在 Corex 管从下向上依次放置塑料填充物、塑料接合体、盖玻片和 40%的甘油垫，用宽口吸头将提取物反应物平铺到甘油垫上；(B) 用旋翼式转头离心，沉淀物星体和纺锤体通过甘油置于到盖玻片上；(C) 吸出甘油垫后，用金属钩或微型刮铲钩住接合体一侧的凹槽，将其拉出；(D) 用 Watchmaker's 镊子将支持体上的盖玻片放到−20℃甲醇中固定

1. 将至多 50μl 的提取物反应液加到 1.5ml 微量离心管中，并快速平稳地加入 30%的甩片稀释缓冲液 1ml。
2. 用宽口（200～1000μl）移液吸头将混合物平铺到 5ml 40%的甩片垫（放在装有 12mm 圆形盖玻片的 15ml Corex 管中）上（见图 12.7.1）。用 HB-4 或 HB-6 转头，16℃ 17 000*g* 离心 15min。

如果制备大量的样品，可以用 16 管容量的 HS-4 转头。16℃ 5390g 离心 25min。

3. 吸出上清，轻轻地用金属钩或微型刮铲拉出塑料支持体。用 Watchmaker's 镊子取下支持体上的盖玻片，放到盛有甲醇的陶瓷染色架上，在玻璃染色盘中 −20℃ 固定 5min。
4. 将盖片以正面向上放置于孵育槽内的封口膜上，滴一滴冲洗缓冲液。轻轻地推动每张盖片穿过液滴，使盖片贴在封口膜上。
5. 吸去冲洗缓冲液，再向每一盖片滴加 200μl 灭菌的 PBS/3%BSA，封闭盖片降低背景。室温下孵育 10min。
6. 可选项：如果需要，用 PBS/3%BSA 配制的一抗和二抗分别染盖片 15min。每种抗体孵育后，用大量的冲洗缓冲液漂洗盖片 4 次。
7. 用 1∶2000 稀释的 10mg/ml Hoechst 染液（终浓度为 5μg/ml）染 DNA 1min。用冲洗缓冲液漂洗 4 次，将盖片倒置放在有 3μl 封固剂的显微镜载玻片上。吸出多余的封固剂，用指甲油封片。将载玻片于 4℃暗置可保存 1 年。

支持方案 5　制备 DNA 包被磁珠

应用磁珠结合质粒 DNA 可以在更小的体系中进行纺锤体组装的检测。

材料（带√项见附录 1）

50μg 经柱（Qiagen）层析纯化的质粒 DNA（<5kb）
合适的限制性内切核酸酶（如 *Not* Ⅰ、*Bam*H Ⅰ）
√灭菌的 TE 缓冲液，pH 8.0
Klenow DNA 聚合酶（exo-）和缓冲液（New England Biolabs）
核苷酸：生物素-dATP（Life Technologies），生物素-dUTP（Clontech），硫代-dCTP 和硫代-dGTP（Pharmacia）
G-50 Nick 柱（Amersham Pharmacia Biotech）
冲洗液和结合液，Kilobase Binder 试剂盒（Dynal）
链霉亲和素 Dynabeads，Kilobase Binder 试剂盒（Dynal）
√磁珠缓冲液
磁珠浓缩器（MPC；Dynal）
16℃ 旋转器

1. 用 Qiagen-style 柱纯化质粒 DNA。

   当 DNA 序列不是很重要时，质粒应大于 5kb，以更有效地诱导提取物中染色质组装。

2. 用两种在多接头序列具有单一酶切位点的限制性内切核酸酶切割 50μg DNA，产生一个短的和一个长的 DNA 片段。

   应对内酶切进行选择，使长片段的一端带有 G 和 C 突出末端，另一端只含 A 和 T（如 *Not* Ⅰ、*Bam*H Ⅰ）。

3. 用乙醇沉淀线性化 DNA，用 TE 缓冲液（pH 8.0）25μl 重悬沉淀。A_{260}定量检测（附录 3D）。
4. 制备填充反应液，组成为：1×Klenow 缓冲液，30μg 线性化 DNA，50μmol/L 核苷酸（生物素-dATP，生物素-dUTP，硫代-dCTP 和硫代-dGTP），20U Klenow 聚合酶，以及足量的水使终体积为 70μl。37℃温育 2h。
5. 按照产品说明书，用 Pharmacia G-50 Nick 柱除去未结合的核苷酸和小的 DNA 片段。A_{260}定量检测回收情况（附录 3D）。
6. 将 400μl 生物素化的 DNA（步骤 4）和 400μl 结合液混合，以制备偶联混合液。取出 25μl 供以后评价偶联效率之用。
7. 按照产品说明书，制备 4μl 链霉亲和素磁珠 Dynabeads，供每毫克 DNA 偶联之用。用磁珠浓缩器（MPC）回收磁珠。用 5 倍体积的结合液清洗一次（120μl 磁珠使用 600μl 液体）。回收磁珠并用含 DNA 的偶联混合液重悬磁珠。将磁珠/偶联混合液在旋转混合器上 16℃孵育几小时或过夜。
8. 用 MPC 回收磁珠。保留上清。比较上清液和偶联前样品（步骤 3）的 A_{260}，定量测定固定化 DNA 量。
9. 用 500μl 冲洗缓冲液清洗磁珠两次，再用 500μl 磁珠缓冲液清洗两次。最后一次清洗后，将磁珠重悬于足量的磁珠缓冲液中，使固定化 DNA 的终浓度达到 1μg/5μl 磁珠。4℃可保存 1 年。

参考文献：Murray et al.，1991

撰稿人：John Merlie Jr. and Rebecca Heald

单元 12.8 利用非洲爪蟾卵提取物研究细胞凋亡

将含有线粒体的爪蟾卵间期粗提物继续孵育，线粒体中的细胞色素 *c* 就会释放出来，从而导致半胱冬裂酶（caspase）活化。此时如有细胞核存在，就会发生核的裂解凋亡。此外，caspase 抑制因子和抗凋亡蛋白 Bcl-2 可抑制此凋亡过程。

基本方案 制备凋亡提取物并检测凋亡过程

材料

爪蟾卵间期粗提物（单元 12.5）
0.2mol/L 磷酸肌酸
0.5mg/ml 肌酸激酶
0.2mol/L ATP
Hoechst 33258（Bisbenzimide H 33258；Calbiochem）
荧光显微镜

1. 向爪蟾卵间期粗提物中加入下列组分以制备 ATP 再生系统：0.2mol/L 磷酸肌酸、0.5mg/ml 肌酸激酶和 0.2mol/L ATP，使浓度分别达到 20mmol/L（1：10 稀释）、

5μg/ml（1∶100 稀释）和 2mmol/L（1∶100 稀释）。混匀，室温下孵育 4～8h。从 3h 开始，每隔 30min 观察一次核的形态。

2. 用 Hoechst 33258 染细胞核，通过荧光显微镜观察核的形态来确定凋亡的开始。

备择方案 将凋亡分成潜伏时相和执行时相

材料（带√项见附录 1）

新鲜制备的爪蟾卵，用卵裂解缓冲液清洗（单元 12.5）

0.2mol/L 磷酸肌酸

0.5mg/ml 肌酸激酶

0.2mol/L ATP

√20×能量再生混合液

去膜精子染色质（单元 12.5）

Hoechst 33258（Bisbenzimide H 33258；Calbiochem）

15ml 聚丙烯离心管

5ml 注射器和 18 号针头

为获得潜伏时相提取物，应严格按照单元 12.5 的基本方案 1 和备择方案所述方法制备分级分离间期提取物，并进行如下改动。

1. 将新鲜爪蟾卵用卵裂解缓冲液清洗后，立即转入 15ml 聚丙烯离心管中（见单元 12.5，基本方案 1，步骤 3），置于冰上，直到离心使其裂解（见单元 12.5，基本方案 1，步骤 6）。裂解离心完成后，再次置于冰上，直到高速离心（见单元 12.5，备择方案 1，步骤 2）。
2. 用 5ml 注射器和 18 号针头从 15ml 聚丙烯离心管中收集粗提物，不加入另外的蛋白酶抑制剂和细胞松弛素 B。
3. 继续进行制备分级分离间期提取物所需的步骤（见单元 12.5，备择方案 1）。
4. 解冻分装的分级分离细胞质和膜成分（单元 12.5）。将 10μl 的膜成分与 100μl 的细胞质重新混合，加入 0.2mol/L 磷酸肌酸、0.5mg/ml 肌酸激酶和 0.2mol/L ATP，使浓度分别达到 20mmol/L（1∶10）、5μg/ml（1∶100）和 2mmol/L（1∶100）。混匀，室温下孵育 2.5h。
5. 制备新鲜的间期粗提物（见单元 12.5，基本方案 1）。加入 20×能量再生混合物，使其稀释为 1×。
6. 将去膜精子染色质加入到执行时相提取物中，稀释至浓度为每微升 1000 个核。
7. 以 1/10 体积比将潜伏时相提取物加入到执行时相提取物中（例如，5μl 的潜伏时相提取物加到 50μl 的执行时相提取物中）。轻弹使其混合均匀，室温下孵育。每 10min 取样，用 Hoechst 33258 染色（如核蛋白输入实验；见单元 12.5，基本方案 3）。观察凋亡的核。

30min 时核形成，通常在 60～120min 出现凋亡。

支持方案 1　检测 Caspase3 样活性

Caspase 的体外分析是基于对连接有生色基团和荧光基团的合成肽 caspase 底物的切割。当该底物被来自凋亡细胞提取物的相关 caspase 切割后，结合的发色基团或荧光基团将被释放，从而可用荧光计或分光光度计进行检测。

材料（带√项见附录 1）

√分析缓冲液，室温
　凋亡卵提取物（见基本方案或备择方案）
√切割底物：2mmol/L Ac-DEVD-pNA
√切割抑制物：20×Ac-DEVD-CHO
　96 孔微量滴定板

1. 为检测每个样品/时间点中的 caspase3 样活性，向 96 孔微量滴定板的各孔中加入室温的 85μl 分析缓冲液，置于室温。
2. 向孔中加入 1～5μl 需检测的凋亡卵提取物，再加入 10μl 作为 caspase 切割底物的 2mmol/L Ac-DEVD-pNA。拍打板边将其混匀，在 37℃培养箱中孵育 1h。
3. 加入 5μl caspase 切割抑制物 20×Ac-DEVD-CHO 终止反应。实验结束时在 405nm 处测定所有样品吸收值。

支持方案 2　利用爪蟾卵提取物制备线粒体

材料（带√项见附录 1）

　分级分离间期提取物（见单元 12.5，备择方案）
　Percoll 溶液（见表 12.8.1）

表 12.8.1　梯度 Percoll 溶液的制备

组分	%Percoll			
	42%	37%	30%	25%
MIB 缓冲液浓缩物[a]	0.612ml	0.612ml	0.612ml	0.612ml
Percoll	1.05ml	0.92ml	0.75ml	0.25ml
水	0.838ml	0.968ml	1.14ml	1.263ml

a. 见 MIB 的配方。

√MIB 缓冲液
　2.5ml 超速离心管（如 Beckman）
　Beckman TL-100 台式超速离心机和 TLS-55 旋翼式转头

1. 收集分级分离间期提取物的细胞质和轻膜成分。除去轻膜成分后，轻柔地用去尖端的移液吸头和 P-200 微量移液器吸取重膜成分。将材料置于冰上。

   线粒体/重膜成分是直接位于轻膜成分下的棕色不透明层。重膜成分下的透明层中含有大量的色素颗粒和糖原。

2. 向 TLS-55 旋翼式转头配备的 2.5ml 超速离心管内依次缓慢加入 42%、37%、30% 和 25%的 Percoll 溶液各 0.45ml，制备每一样品分析所需的 Percoll 梯度。
3. 在梯度溶液的顶部加入从 1 或 2 只爪蟾卵提取物获取的整个线粒体层。4℃ 53 500*g* 离心 25min，不使用制动开关。
4. 用巴斯德吸管吸出重膜/线粒体（单独的深棕色层），再用 50 体积的 MIB 缓冲液重新悬浮。轻柔地颠倒试管以达到混合。4℃ 1700*g* 离心 10min 得线粒体沉淀。
5. 弃去上清，用等体积的 MIB 缓冲液重悬线粒体沉淀，得 10×储存液，以备加入到重组的提取物内。

支持方案 3　检测细胞色素 *c* 的释放

材料

凋亡卵粗提物（见基本方案）
抗细胞色素 *c* 抗体（Pharmingen）
0.1μm 绝不含 MC 的滤器（Millipore）

1. 在不同的时间间隔（如 0.5～1h 间隔），等量取出 25μl 凋亡卵粗提物，用 0.1μm 绝不含 MC 的滤器过滤。

   此步骤去除了线粒体和其他一些颗粒物质。滤器上的上清中含有已经释放到细胞液中的细胞色素 *c*。

2. 取滤器上的 7μl 上清，SDS-PAGE（单元 7.1）电泳分离，用抗细胞色素 *c* 抗体进行免疫印迹（单元 7.7）。

支持方案 4　用纯化的线粒体和细胞质检测细胞色素 *c* 的释放

在一些情况下，需要分别制备细胞质和线粒体用于重建细胞色素 *c* 释放过程。

材料

含线粒体的重膜成分（见支持方案 2）
含能量再生混合物的细胞质组分（单元 12.5）

1. 将 14μl 含线粒体的重膜组分和 170μl 含能量再生混合物细胞质组分混合，室温孵育。
2. 每隔 0.5h 取 25μl 样品，过滤，对含细胞色素 *c* 的上清进行电泳（单元 7.1）及免疫印迹分析。

参考文献：Bellamy et al.，1995；Newmeyer et al.，1994
撰稿人：Sally Kornbluth and Erica K. Evans

单元 12.9　体外转录

真核生物的生长、分化以及发育过程的调节很大程度上是在转录水平上进行的。应用能阐明各种转录因子特性和功能的体外转录体系，可以了解转录调节的分子生物学机制。

注意：这些方案中使用的所有试剂均为高纯度的分子生物等级，且无 RNA 酶和 DNA 酶。同样，所有的塑料器皿也应无 RNA 酶。实验过程中更要尽量避免 RNA 酶的污染。

基本方案　利用核提取物进行体外转录反应

材料（带√项见附录 1）

核提取物（见支持方案 1、2 或 3）
10%（w/v）聚乙烯醇（PvOH；mol. wt. 10 000；Sigma）
10%（w/v）聚乙二醇（PEG；mol. wt. 15 000～20 000）
1mol/L HEPES（钾盐），用 KOH 调节 pH 7.6 和 pH 8.0
200 ng/μl DNA 模板，用 pH 8.0 TE 缓冲液配制（TE 缓冲液见配方）
√5mmol/L 核糖核苷酸-5′-三磷酸（rNTP）
√转录终止液
0.3mol/L 乙酸钠
25∶24∶1（v/v/v）苯酚/氯仿/异戊醇（PCIAA），用 10mmol/L pH 7.5 Tris-Cl 平衡
75%和 100%乙醇
30℃和 37℃水浴

1. 将实验所需的足量核提取物分装品置于冰-水浴中，使其迅速解冻。同时解冻分装的 10%PvOH、10%PEG 和 5mmol/L rNTP。
2. 制备下列混合物（根据待检样品的管数将各试剂用量加倍）：
   2.5μl 10%PvOH
   2.5μl 10%PEG
   0.5μl 1mol/L HEPES（钾盐），pH 8.0
3. 按照下列顺序用 1.5ml 微量离心管在冰上配制每一样品混合液，加入后混匀。
   6.0μl H_2O
   5.5μl PvOH/PEG/HEPES 混合物（来自步骤 2）
   10.0μl 核提取物（或根据经验的最佳量）
   1.0μl 200 ng/μl DNA 模板（或根据经验的最佳量）

如果需要，除了提取物，在此步骤还可以加入纯化的转录因子或层析纯化得到的洗脱成分，代替部分或全部水。

如果使用的核提取物<10μl，体积应用含0.1mol/L KCl的TM缓冲液补充；如果使用的核提取物>10μl，则应减少水的体积。

4. 在室温（约21℃）孵育15min以形成前起始复合物。
5. 使用前，如下制备rNTP混合物：

   0.5μl 1mol/L HEPES（钾盐），pH 7.6

   2.5μl 5mmol/L rNTP

   4.5μl H_2O

6. 向步骤4孵育的反应物中加入2.5μl步骤5制备的rNTP混合物，启动转录。30℃孵育30min。

   利用α-鹅膏菌素的抑制作用作为对照。向反应混合物中加入1μl 100μg/ml的α-鹅膏菌素，使其终浓度为4μg/ml。RNA聚合酶Ⅱ可被0.5μg/ml的α-鹅膏菌素抑制；RNA聚合酶Ⅲ可被200μg/ml的α-鹅膏菌素抑制；RNA聚合酶Ⅰ不被α-鹅膏菌素抑制。

7. 加入100μl转录终止液，混合均匀，在37℃孵育10min，终止反应。再加入0.3mol/L的乙酸钠250μl。
8. 用400μl的25：24：1 PCIAA提取每份样品。将每管中的含水相转移到一个新的1.5ml微量离心管中。加入1ml 100%乙醇，混合均匀。室温下以最大速度微量离心15min，收集RNA沉淀。
9. 小心吸去白色沉淀表面的液体，向每管中加入75%乙醇400μl。室温下，以最大速度微量离心15min。小心吸去所有沉淀上清，在旋转蒸发器（如Speed Vac）中干燥沉淀。储存于−20℃，或立即进行引物延伸分析（见支持方案4）。

支持方案1　用HeLa细胞制备核提取物

注意：所有步骤均应在4℃（即在冰上或冷室中），使用预冷的溶液、玻璃器皿和设备进行。所有离心过程均应用预冷的转头在4℃下进行。高速离心需在超速离心机中进行。

材料（带√项见附录1）

约5×10^5～8×10^5个/ml的HeLa细胞悬浮培养于旋转烧瓶（12L）中

√磷酸缓冲液（PBS）

√冷冻缓冲液

甘油

√含1g/L $MgCl_2$的PBS

√低渗缓冲液

√高盐缓冲液

粉末状硫酸铵

含有和不含有 0.1mol/L KCl 的 TM 缓冲液

Beckman JS-4.2 和 SW-28，Sorvall GSA 和 SS-34 转头（或相当设备），配套的离心瓶和离心管

40ml Wheaton Dounce 匀浆器，配有 B 型（疏松型）研杵（或相当设备）

绝缘的磁力搅拌盘

咖啡豆研磨机或研钵和研杵

透析袋（12 000～14 000 MWCO）

电导仪（备选项）

1. 将 12L 在标准条件下（每毫升约含 5×10^5～8×10^5 个细胞）旋转培养的 HeLa 细胞，用大容量制备型低速转头 4℃ 1800g 离心 15min。
2. 用 PBS 液重悬细胞沉淀（每升原培养液加 PBS 液 25～50ml），混合后如步骤 1 再在 1 或 2 个瓶子中离心。
3. 用冷冻缓冲液重悬细胞沉淀（每升原培养液加冷冻缓冲液 2ml）。加甘油至 20%（v/v），这必须考虑到原来冷冻缓冲液中含有 30%的甘油（v/v）、细胞占的体积以及细胞悬液的终体积。
4. 将细胞等量分装于 50ml 锥形塑料管中，液氮冷冻，储存于－80～－100℃。
5. 尽快解冻（如果被冷冻）置于冰水浴中取自 12L 培养液的 HeLa 细胞。4℃ 1400g 离心 10min，向沉淀中加入含 1g/L $MgCl_2$ 的 PBS 液 200ml，1400g 离心 10min，弃去疏松细胞沉淀上的上清，以同样的方式再洗一次。
6. 弃去上清，用 60ml 低渗缓冲液重悬细胞。在冰上孵育 15min，使细胞膨胀。
7. 用带有疏松 B 型研杵的 Dounce 匀浆机抽提 12 次裂解细胞。4℃ 3000g 离心 8min，收集细胞核沉淀。

   将分装的细胞用台盼蓝染色（单元 1.1），可使裂解细胞的细胞核着色。在显微镜下观察细胞的裂解情况。应达到 90%的裂解率。

8. 弃去上清，将分离的细胞核重悬于总体积 20ml 的低渗缓冲液中。倒入已称重的 SS-34 离心管中，4℃ 3000g 离心 8min。弃去上清，称取核重量（通常每 12L 培养的 HeLa 细胞能得到 12g 细胞核）。
9. 用 70ml 高渗缓冲液重悬细胞核，倒入 200ml 玻璃烧杯。将其置于绝缘磁力搅拌盘上的冰水浴中，慢慢搅动 30min。
10. 将悬液倒入 Beckman SW-28 转头配备的厚壁离心管中。配平后在旋翼式转头中，4℃100 000g 离心 60min。
11. 收集上清，倒入刻度量筒中量取体积（应为 70～75ml）。将收集到的上清转移到 200ml 玻璃烧杯中，将其置于绝缘磁力搅拌盘上的冰水浴中慢慢搅动。15～20min 后，缓慢加入粉末状硫酸铵，每毫升上清加 0.33g 硫酸铵（0℃时的饱和度为 55%）。所有硫酸铵均加入并溶解后，再搅拌混合物 25～30min。
12. 将混合物于 4℃ 35 000g 离心 20min。尽量多地吸去上清。用总体积 5～6ml 的 TM 缓冲液溶解沉淀，收集到一个管中。

    硫酸铵沉淀物很难溶解。最理想的方法是，向每份沉淀中加大约 1.5ml TM 缓冲

液，反复上下柔和地吹打，以使沉淀分散、重悬。合并收集后，用 1ml TM 缓冲液清洗离心管和吸管，并倒入样品管中。沉淀溶解后溶液为奶白色。

13. 用 12 000～14 000 MWCO 透析袋对提取物透析除盐。

    2L TM 缓冲液 透析 1h

    2L 含 0.1mol/L KCl 的 TM 缓冲液 透析 1h

    2～4L 新换的 0.1mol/L KCl 的 TM 缓冲液 透析 1h

14. 从透析袋中取出提取物，4℃ 12 000g 离心 10min，除去任何不溶物质。将大约 7ml 上清以 150～200μl 等量分装。液氮冷冻，并储存于－80～－100℃。

支持方案 2　制备高盐果蝇核提取物

注意：此方案需要约 100g 胚胎，也可以根据需要按比例增减。如果使用冻存的胚胎或储存时间超过 3 天的胚胎将会使转录提取物活性大大下降。

注意：所有步骤均应在 4℃（即在冰上或冷室中），使用预冷的溶液、玻璃器皿和设备进行。所有离心过程均应用预冷的转头在 4℃下进行。

材料（带√项见附录 1）

果蝇饲养箱

√糖蜜/琼脂平板

漂白剂（5.25％次氯酸钠），用 1∶1 蒸馏水稀释（室温保存）

胚胎清洗液：0.7％（w/v）NaCl/0.04％（v/v）TritonX-100（室温保存）

√破碎缓冲液

√重悬缓冲液

4mol/L 硫酸铵，pH7.0

固体硫酸铵

含 0.1mol/L KCl 的 HEMG

胚胎收集器（图 12.9.1）和油漆刷

构成胚胎收集装置的尼龙网（Tetko，＃3-70/43 和 3-500/49）和链锁环

Yamato LH-21 匀浆机（Thomas）

4 张 Miracloth*（9in×9in；Calbiochem）

GSA，45-Ti 和 SS-34（相当设备）转头，配套离心瓶和离心管

40ml 带有 B 型的 Wheaton Dounce 匀浆机和 15ml 带有 A 型研杵的匀浆机

旋转混合器

咖啡豆研磨机

5cm×22cm G-25 SF 除盐柱（430ml；Amersham Pharmacia Biotech）

电导仪

---

* miracloth：一种孔径为 22～25μm 的聚酯人造纤维滤布。

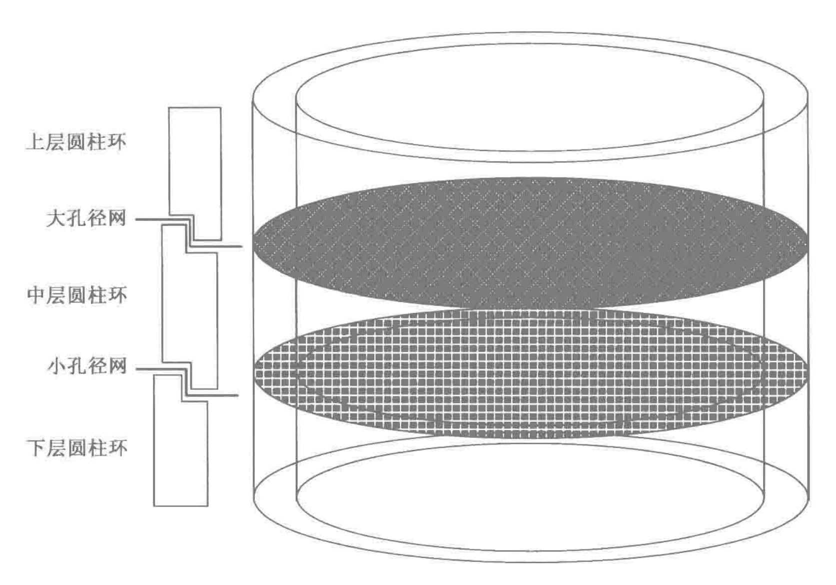


图 12.9.1　果蝇胚胎收集器

由三个连锁的圆柱状环构成，圆柱状环间夹有两个不同孔径的尼龙网。大孔径网（Tetko 3-500/49）位于上面环与中间环之间，用来收集死的果蝇和大的颗粒物质。小孔径网（Tetko 3-70/43）位于中间环与下面环之间，用来收集胚胎，但允许酵母菌滤过。此装置的直径可以不同，一般来说高为 3in，直径为 10in 比较理想

1. 将野生果蝇以 25℃，75%湿度饲养于群体饲养箱中（Goldstein and Fyrberg 1994）。将胚胎收集在糖蜜/琼脂平板上。

   受精后 0～12h 收集的胚胎可以使用。平板最多可在 4℃下放置 3 天。

2. 收集胚胎收集器中 0～12h 的胚胎（图 12.9.1）。用油漆刷和蒸馏水将糖蜜/琼脂平板上的胚胎冲洗到置于槽中的收集器的大孔尼龙网上。收集所有胚胎后，取出上层圆柱环和留有死果蝇及颗粒物质的粗网。
3. 在胚胎中如有杂质颗粒，将其除去，并在装有中层和下层圆柱环的收集器中仔细清洗，以除去酵母菌。
4. 将盛有胚胎的收集器置于 Nalgene 桶内。将 3L 漂白剂/蒸馏水（1∶1）加到置于 Nalgene 清洗桶内的胚胎收集器中，旋转混合。在漂白液中浸泡≤90s，除去绒毛膜酶。将浸于漂白液中的胚胎收集器从桶中取出，排净漂白液。
5. 迅速将 1L 胚胎清洗液倒入胚胎收集装置中，旋转混合，清洗胚胎。再用 3L 水洗去残留的胚胎清洗液和漂白液。
6. 在胚胎收集装置的小孔尼龙网下放置一张纸巾，吸干水分，使胚胎干燥为一饼状物。用已称重的烧杯称量胚胎重量。
7. 向每克胚胎中加入 3ml 破碎缓冲液，搅棒搅动使胚胎分散均匀。用 Yamato LH-21 匀浆机以 1000r/min 匀浆一次，破碎胚胎。
8. 将组织匀浆倒入安装在 GSA 瓶上内部衬有一层 Miracloth 的漏斗中。待每一漏斗中的液体都流入 GSA 瓶后，再加入破碎缓冲液清洗 Miracloth 上的残留物（每克胚胎加 2ml）。

9. 4℃ 10 000*g* 离心 15min，收集细胞核沉淀。沉淀会很松散，因此应小心弃去上清。再用擦镜纸擦掉离心管壁上的脂质。

10. 用破碎缓冲液重悬细胞核（每克胚胎加 3ml），小心旋转混合。注意不要将紧贴在瓶上的黄色卵黄再次悬浮。将核悬液倒入 40ml 带有 B 型研杵的 Dounce 匀浆机内，将核分散，然后转入干净的 GSA 瓶中。

11. 按步骤 9 的方法再次离心，小心弃去上清，擦掉离心管壁上的脂质。用重悬缓冲液（每克胚胎加 1ml）重悬细胞核。用 40ml 带 B 型研杵的 Dounce 匀浆机打碎细胞核团块（3 次抽提即可）。

12. 用 250ml 刻度量筒准确测量体积后倒入 45-Ti 瓶中。向每个瓶中加入瓶内液体体积 1/10 的 4mol/L 硫酸铵（20℃时的饱和度为 9%）。颠倒混合，再在旋转混合器上混合 20min。

13. 将裂解的核在 4℃ 142 400*g* 离心 15min。

14. 在离心时，进行下列准备工作：

    a. 在咖啡豆研磨器中粉碎硫酸铵结晶。

    b. 磁力搅拌器上制作冰浴，用于硫酸铵沉淀。

    c. 用两个柱体积含 0.1mol/L KCl 的 HEMG 平衡 G-25 SF 脱盐柱，流速为 400ml/h。

15. 吸取裂解核上清液，尽量避免离心管上部的脂滴。准确称量合并后的上清体积，并将其倒入加有磁力搅拌子的 400ml 的烧杯中，置于预先制备的冰浴中。缓缓（约 5min）加入粉末状硫酸铵（每毫升上清加 0.3g）（20℃时的饱和度为 56%），继续搅动 15min。

16. 将硫酸铵沉淀物于 4℃ 27 000*g* 离心 15min。弃去上清，排出沉淀。

    上清是研究 H1 组蛋白的良好材料。

17. 用含 0.1mol/L KCl 的 HEMG 重悬沉淀（每克胚胎加 0.1ml）。用 15ml 带 A 型研杵的匀浆机打散蛋白质团块，4℃ 12 000*g* 离心 10min，除去不溶物。

18. 将蛋白提取物放入平衡的 G-25 SF 脱盐柱中，以 400ml/h 流速进行柱洗脱，监测 280nm 处的吸收值，收集 1min 时的组分，约 7ml。

19. 用考马斯亮蓝检测法检测峰组分的蛋白质浓度（见附录 3B），检测最后要收集的蛋白质组分的电导率。

    如果此蛋白质组分的电导率与含有 0.1mol/L KCl 的 HEMG 完全相同（即 20 mS/cm），说明除盐完全。用 5ml 蒸馏水稀释 20μl 样品，检测该溶液的电导率，如为80 mS/cm则说明提取物导电率为 20 mS/cm。如果电导率不吻合，则使用更大体积的柱或对样品进行透析。

20. 收集峰蛋白质组分，按照步骤 18 离心溶液 10min，除去不溶解的碎片。避免离心管上部的脂质。将上清倒入 50ml 带有螺旋盖的聚丙烯管中，液氮速冻，储存于 −100℃。

    通常 100g 胚胎会得到大约 40～50ml 的高盐转录提取物。

支持方案 3　从分离出的果蝇胚胎核制备可溶性核组分

附加材料（见支持方案 2；带√项见附录 1）

√含 0.1mol/L KCl 的 HEMG 20
带有 SW-28 转头的超速离心机

1. 制备细胞核（见支持方案 2，步骤 1～12）。
2. 用重悬缓冲液（每克胚胎加 1ml）重悬细胞核。用 40ml 带 B 型研杵的 Dounce 匀浆机打散细胞核（3 次抽提即可），将全部核悬液转移至已称重的 GSA 瓶中。4℃ 10 000*g*（用 GSA 转头为 8000r/min）离心 10min。
3. 弃去上清，称量 GSA 瓶以测定核的重量。加入含 0.1mol/L KCl 的 HEMG20（每克核加 0.5ml）。
4. 旋转摇动将核重悬（不要使用匀浆机）。将悬液置于冰上 15～60min。4℃ 100 000*g* 在旋翼式转头中（用 GSA 转头为 8000r/min）离心 1h。
5. 离心后，可观察到 4 层结构，从上到下依次为：
   a. 灰白色薄脂质层，用刮铲去除。
   b. 黄色液体层。约占离心管体积的 50%，为可溶性核成分，用移液器吸取此层并转移到 50ml 带螺旋盖的聚丙烯管中。
   c. 灰色液体层。避免吸到此层，因为富含转录抑制物、核酸酶及磷酸酶。
   d. 灰白色的固体层。含核物质，包括 DNA、支架蛋白等。
6. 迅速将提取物（100g 胚胎约得到 15ml）装入 50ml 带螺旋盖的聚丙烯管中（步骤 5 中的 b），液氮速冻，储存于－100℃。

支持方案 4　体外转录产物的引物延伸分析

警告：进行放射性操作时，请采取适当的防护措施以防实验者或环境的污染。请按照当地放射性安全管理部门的规章制度在指定的区域内进行实验操作和处理废物。

注意：本方案中使用的所有试剂均为高纯度的分子生物等级。如果没有特殊提出，所有步骤均在室温下进行，所有微量离心都以最大速度进行。

材料（带√项见附录 1）

与来自体外转录反应的 RNA 产物互补的约 25 个碱基的 DNA 寡核苷酸
T4 多聚核苷酸激酶
150μCi/μl [γ-^{32}P] ATP（7000Ci/mmol；ICN Biomedicals）
2.5mol/L 乙酸铵
10mg/ml 糖原
100% 乙醇
√1×TE 缓冲液，pH8.0

25∶24∶1 (v/v/v) 苯酚/氯仿/异戊醇 (PCIAA)。用 10mmol/L Tris-Cl 平衡，pH7.5

3mol/L 乙酸钠

√5×复性缓冲液

RNA 产物（如来自于基本方案）

√引物延伸混合物

50U/μl Moloney 鼠白血病病毒（MMLV）反转录酶

√甲酰胺负载缓冲液（FLB）

8%尿素-聚丙烯酰胺测序胶

√1×TBE 缓冲液

37℃，58℃，70℃及沸水浴

Whatman 3MM 滤纸

1. 设计、合成并纯化长度为 25 个碱基的 DNA 寡核苷酸引物。

   该寡核苷酸生成的引物-延伸产物长度应为 100～150 碱基（从复性的寡核苷酸的 5′端到转录起始点）。寡核苷酸应用 1×TBE 在高浓度聚丙烯酰胺凝胶（约 10%）中进行电泳纯化，再经洗脱、乙醇沉淀、水中溶解及定量等过程。应设计复性温度为 58℃的寡核苷酸。

2. 制备浓度为 2.5pmol/μl 的引物稀释工作液。
3. 向 1.5ml 微离心管加入 5pmol（2μl）引物，进行放射性标记。先加入 2μl150μCi/μl [γ-^{32}P] ATP，再按照说明书的提示加入 T4 多核苷酸激酶（20μl 反应体系）。37℃孵育 1h。
4. 加入 2.5mol/L 乙酸铵 100μl。加热反应物到 70℃，持续 15min，灭活 T4 多核苷酸激酶。将管冷却至室温，加入 10mg/ml 糖原 2μl 和 100%乙醇 375μl，以沉淀放射性标记的引物。轻柔地涡旋混合。
5. 微量离心乙醇沉淀物 15min。用移液器小心吸去乙醇上清，弃于适当的废物容器中。加入 TE 缓冲液（pH8.0）100μl，涡旋混合溶解沉淀。
6. 加入 100μl 的 PCIAA，涡旋混合。微量离心 5min，分出有机相和水相。将上层水相移至新的 1.5ml 微量离心管中。加入 10μl 的 3mol/L 乙酸钠和 300μl 的 100%乙醇以沉淀放射性标记的引物。涡旋混合，微量离心 15min。
7. 小心吸去乙醇上清。室温放置 10min 晾干沉淀。加入 TE 缓冲液（pH 8.0）150μl（使终浓度为 0.033pmol/μl），涡旋混合溶解沉淀。放射性标记引物于－20℃可储存 3～4 周。
8. 解冻一份与体外转录的 RNA 产物互补的放射性标记引物。配制由 10μl 的 1×复性缓冲液（2μl 的 5×复性缓冲液加 8μl 的 TE，pH 8.0）和 0.25μl 的标记引物（约 8fmol）组成的引物延伸复性混合液，用于一份样品的分析。
9. 向每个含有 RNA 产物的离心管中加入引物延伸复性混合液 10μl，涡旋混合溶解 RNA。70℃加热样品 2min，然后在 58℃孵育 40min，将引物与 RNA 产物/模板复性。

   复性条件的选择取决于引物的长度和 G+C 含量。

10. 迅速微量离心样品，使盖内的样品沉降到管的底部，冷却样品至室温。
11. 加入 40μl 引物延伸混合液和 0.5μl 的 MMLV 反转录酶，用前加入并轻柔涡旋混合。37℃孵育 40min。
12. 加入 100%乙醇 225μl。轻柔涡旋混合，微量离心 15min。弃去乙醇上清，在旋转蒸发器（如 SpeedVac）中干燥沉淀。将沉淀溶解于 6μl FLB，-20℃可保存 2～3 天，或立即进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。
13. 倒入标准的 8%尿素-聚丙烯酰胺测序胶。在水浴中将引物延伸样品煮沸 4min。将样品在 1×TBE 中进行凝胶电泳，直到溴酚蓝示踪剂移至距底部 3～5cm 处。
14. 在一张 Whatman 3MM 滤纸上将胶干燥，将干燥的胶进行磷光显像分析或放射自显影（单元 7.8）。

如果实验的目的是对引物延伸产物的量进行定量，应将胶在 10%的乙酸中固定 15min。在固定胶之前，切去带有游离引物带的部分。因为带有游离引物的胶在固定过程中会发生引物扩散，导致背景增加。

参考文献：Dignam et al.，1983；Goldstein and Fyberg，1994；Kamakaka et al.，1991

撰稿人：Rohinton T Kamakaka and W. Lee Kraus

（张惠丹 译　方　瑾 校）

第13章　细胞黏附与细胞外基质

在胚胎发育、炎症、免疫反应和损伤修复过程中，细胞黏附作用决定组织的组构，并且介导和指引细胞的迁移方向。此外，细胞黏附还参与调控基因表达、细胞生长、细胞分化和凋亡等过程。在过去的20～30年中，对细胞黏附的研究有了长足的进展：从对细胞-细胞黏附和细胞-细胞外基质（extracellular matrix，ECM）黏附的生物物理学和形态学变化等表面现象的研究，到发现了多种特定的细胞黏附体系并进行深入的机制分析，以及最近由于思考模式的改变而使人们把黏附分子看作影响大多数信号转导通路的激活子或调控子。

细胞黏附分子通过在细胞表面形成特异性的蛋白-蛋白连接或蛋白-糖类连接来介导细胞间的相互作用。此外，细胞黏附分子（或细胞黏附的受体）常常在细胞膜的胞质面与多分子蛋白质复合体直接连接。这些胞质黏附复合物和信号分子复合物能够与细胞骨架和各种信号转导通路发生相互作用。总之，细胞黏附不仅把细胞与其他细胞和细胞外基质联系起来，还有助于细胞外物理变化与细胞内信号转导通路的整合。

通常，细胞黏附被分为两类，即细胞-细胞黏附和细胞-底物黏附。不论是哪一种黏附，介导细胞黏附的物理结构可以是特定的黏附结构，也可以是细胞质膜的大范围伸展。例如，细胞可以利用通用的黏附分子如钙黏素（cadherin），沿着细胞质膜，与其他细胞形成黏附。此外，细胞也可以利用特殊的黏附结构（如桥粒、黏着连接、紧密连接等）来与其他细胞形成黏附。每一种连接复合物都是由特定的黏附分子所组成的，这些黏附分子（如钙黏素和一些相关的胞浆成分）可以将连接复合物与含有肌动蛋白的细胞骨架联系起来。成纤维细胞也可以与其他成纤维细胞形成黏附，但是它们最明显的特征是与细胞外基质的分子发生黏附性相互作用。这种细胞与基质之间形成的黏附位点可以是较大范围的区域，也可以是特殊的黏附结构。例如，快速移动的细胞通常与底物形成大面积的接触，即紧密接触（close contact），而上皮细胞的整个底面都通过整合素（integrin）与下面的基膜发生黏附。特殊的黏附结构还包括上皮细胞的半桥粒，成纤维细胞和内皮细胞的黏着斑（focal adhesion）。细胞-基质黏附复合体与细胞-细胞黏附复合体是由不同类型的黏附分子、细胞骨架分子和信号转导分子所组成的，但有时组成它们的蛋白质有一定的交叉，如纽蛋白（vinculin）和肌动蛋白（actin）。

在单元13.1中介绍了两种用半定量方法测定细胞黏附能力的技术。第一种方法是细胞伸展试验（cell spreading assay），即在显微镜下计数伸展的细胞，通过测定在底物上面伸展的细胞的比例来比较细胞的黏附能力。第二种方法是在洗去未黏附的细胞后，利用比色法定量来衡量细胞的黏附能力。

McClay离心试验（单元13.2）是直接定量测定细胞对底物黏附强度的方法。它通过逐渐增加离心力，从而测定脱落细胞的比例。而通过在光学显微镜下计数染色细胞来定量则使McClay离心试验变得更为简便，这也使该试验的适用性更强，更容易被广大

科研人员所接受。

在单元 13.3 中，发现了钙黏素介导的细胞-细胞黏附的研究者提供了一种分析细胞-细胞黏附的方法，包括定量和定性地鉴定钙黏素的方法。除了提供对短期培养细胞和长期培养细胞的细胞-细胞黏附测定的详细方法，这种试验体系还提供了一种对聚集培养的不同种类细胞的混合物中细胞的分类能力进行测定的方法。此外，还有针对钙黏素和相关的连环蛋白（catenin）的各种检测方法，以及利用显性-负抑制剂（dominant-negative inhibitor）来显示这种非常重要的细胞-细胞黏附体系。

单元 13.4 描述了当今用来分析整合素功能的实验方法，即分析由整合素所介导的细胞-底物黏附和细胞-底物相互作用。这一节中也提供了在体外分析整合素与其配体的相互作用的详细实验步骤。

单元 13.5 中列出了研究钙离子介导的细胞-细胞黏附蛋白的主要组分，即细胞黏附分子免疫球蛋白超家族（IgSF-CAM）的详细实验方法。该家族含有超过 100 个黏附分子。这一节描述了如何从组织或培养物上清中纯化细胞黏附分子免疫球蛋白超家族，还介绍了一些在体外和在活细胞中鉴定其生物学功能的方法。利用荧光标记的磁珠作为模拟分子，可以在分离细胞中或在与细胞相互作用的过程中，分析细胞黏附分子免疫球蛋白超家族的黏附功能。还有一些实验技术，如转染、底物黏附、分子内相互作用以及功能破坏试验，为研究这种主要的黏附蛋白的功能和作用机制提供了有效的工具。

多细胞有机体的大多数细胞常常与细胞外基质发生相互作用。细胞外基质（ECM）不仅能为细胞提供结构支撑，还提供了一些重要的调控信号控制细胞的生长、代谢和分化。所有类型的上皮细胞都需要基膜处的细胞外基质成分的存在，他们需要黏附在细胞外基质上，以保持其特征性的细胞极性、分化状态以及特异性的基因表达。结缔组织细胞被胶原、蛋白多糖和其他细胞外基质成分所围绕。即使是循环血液中的细胞（如淋巴细胞），也可以与细胞外基质发生大范围的相互作用，这是因为它们可以在发生再循环和炎症时穿过血管壁进入组织中。在动态的组织重建（如胚胎发育和损伤修复）过程中，细胞运动的作用很明显，而细胞外基质对细胞运动而言是非常关键的。此外，肿瘤细胞必须侵袭并穿过基膜和结缔组织才能向远处转移。

在上述的各种细胞生物学过程中，细胞外基质不仅可以作为细胞黏附和迁移的结构支架，而且还可以通过细胞外基质的受体触发信号转导效应。特定的细胞外基质分子与质膜受体结合后，可以激活某些信号转导通路，如各种酪氨酸和丝-苏氨酸激酶家族、MAP 激酶家族、离子流动、磷酸肌醇和花生四烯酸信号通路。最近，由于人们逐渐认识到细胞外基质参与调节了许多重要的细胞生物学功能，并且得到了纯化的细胞外基质分子，从而使对这些复杂过程的研究得以迅速发展。

把纯化的细胞外基质分子作为黏附底物来研究是人们广泛使用的一种方法。利用亲和层析技术，可以将纤连蛋白（fibronectin）和玻连蛋白（vitronectin）从人的血浆中分离出来，这为多种类型细胞的细胞培养研究提供了大量的单一黏附蛋白。单元 13.6 中提供了一种简单有效的从血浆中纯化得到大量纤连蛋白的方法。还列出了两种实验方法，可以通过从细胞表面抽提和促使细胞向无血清培养基分泌纤连蛋白的方法，纯化得到源于细胞的纤连蛋白；而这种类型的纤连蛋白含有额外的蛋白序列，能够增强其黏附性能。单元 13.7 描述了一种分离玻连蛋白的简便方法，而玻连蛋白则是与多数细胞

（如在含10%血清的培养基中培养的贴壁细胞）相关的一种细胞黏附蛋白。

由于细胞外基质通常是以立体的形式存在的，其发挥的作用比细胞外基质各个成分的作用总和更强，因此细胞生物学家有时也会使用细胞外基质凝胶（ECM gel）来进行实验研究。单元13.8详细给出了胶原凝胶（gels of purified collagen）和基质胶基膜抽提物（matrigel basement-membrane extracts）的配制和使用方法。利用胶原凝胶（collagen gel）和基质胶（matrigel），可以研究上皮细胞、成纤维细胞以及其他细胞的立体行为。基质胶还可以用来做动物的血管生成试验（单元13.8）和肿瘤细胞的侵袭试验（单元14.2），以及用来促进那些不在体内生长的原代肿瘤细胞的存活和增殖。

另一种方案是利用培养细胞生成完整的细胞外基质，然后把细胞单层剔除掉，剩下的就是具有三维结构的细胞外基质。单元13.9中叙述了制备两种类型的细胞外基质的方法，这种基质可以用作体外试验的黏附底物。

在活的有机体中，其细胞外基质通常表现为一种纤维状的、立体的基质。尽管胶原凝胶和基质胶提供了一种三维立体的细胞培养模型，但近来的研究表明，某些细胞需要与其体内微环境更接近的基质相互作用才能形成正常的细胞黏附，这些基质也可以增强细胞的附着、迁移和增殖能力。单元13.10提供了一种得到成纤维细胞来源的三维立体细胞外基质（与体内的基质相似）的方法；同时还有检测细胞对这种基质的黏附能力和形态学变化的方法，以及得到作为对照的二维黏附底物的方法。

尽管蛋白多糖是细胞外和细胞表面分子的主要组分之一，并且在细胞的调控和结构方面起着各种重要的作用，但很多研究人员对于是否去研究他们却很犹豫，这是因为研究蛋白多糖存在技术上的难点。据我们所知，这些大分子、高电荷、易于聚集的分子不仅存在于细胞外基质，还通过磷脂与细胞膜相连，有时还以跨膜形式存在（如多配体蛋白聚糖，syndecan），甚至还会存在于某些细胞的内部。单元13.11中介绍了许多分离和分析这些广泛分布，并在信号转导、黏附和细胞外基质结构中发挥作用的蛋白多糖的实验方法，还有一些重要的注意事项。

细胞外基质的糖蛋白和蛋白多糖并不是稳定的，它们处于一种合成与降解的动态平衡过程中。因此，蛋白水解酶（尤其是基质金属蛋白酶，matrix metalloproteinase，MMP）对细胞外基质适度的降解，控制着胚胎生长发育和组织损伤修复过程中细胞外基质的连续周转（turnover）和主动重建的过程。基质金属蛋白酶可以被激活，也受抑制剂（如TIMP和α2-巨球蛋白）的调控。单元13.12提供了一系列研究基质金属蛋白酶的方法，包括活细胞胶原降解试验，以及直接或间接酶谱分析。

撰稿人：Kenneth M. Yamada

单元13.1　细胞-底物黏附试验

警告：戊二醛和结晶紫属于危险化学品，在接触、储存和清理时请采取相关的预防措施。

注意：所有与活细胞接触的液体和设备都必须是无菌的，在处理细胞时要应用无菌操作技术。除非特别申明，所有细胞都应该在湿润的培养箱中，以37℃，5%～10%

CO_2进行培养。注意调节 CO_2 浓度使培养液的 pH 维持在 7.4。

基本方案 1 伸展试验

材料（带√项见附录 1）

感兴趣的黏附分子或结合惰性分子的肽类（支持方案）
√ Dulbecco's PBS (DPBS; Life Technologies)
√ 10 mg/ml 热变性的 BSA 溶液
感兴趣的细胞，在使用之前传代培养至 24 h 以后
含有 25mmol/L HEPES 的 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM/HEPES; Life Technologies; 见溶液配方)，预热至 37℃并充以 5%～10% (v/v) CO_2
2 倍浓度的溶于 DPBS 的外源性试剂（如抗体，肽类）
5% (w/v) 戊二醛（用水稀释成 50%的储备液）
CMF-DPBS/NaN_3：不含二价阳离子的 Dulbecco's PBS (CMF-DPBS; Life Technologies; 见溶液配方)，含有 0.05% (w/v) 的叠氮钠 (NaN_3)
96 孔组织培养微量滴定板 (Costar)
吸引器
多道移液器
15ml 聚丙烯试管
玻璃盖玻片

1. 将黏附分子用 DPBS 稀释至 1～20 μg/ml。在 96 孔组织培养微量滴定板的每个孔中加入 100 μl 黏附分子稀释液，并预留出一个或几个孔以备测量封闭孔板后的本底伸展情况。室温孵育 60 min 或 4℃过夜。

   包被孔板的黏附分子的浓度与以下一些因素有关，如黏附分子的大小、其包被塑料平面的效率、与细胞受体的亲和力等。

   在稀释之前对各种黏附分子的处理要区别对待，例如，一些黏附分子（如纤连蛋白）最好在 37℃快速融化，而另一些（如层粘连蛋白）则最好在冰上缓慢融化。
2. 吸出液体后，用多道移液器在每孔中加入 200 μl 10 mg/ml 热变性的 BSA 溶液，室温孵育 30 min。
3. 在封闭过程中，准备拟测定的细胞的细胞悬液（如单元 1.1 中所述），转移至 15ml 聚丙烯试管中。利用血球计数板（单元 1.1）计数细胞，将细胞以 2×10^5 个/ml 的浓度重新悬浮于预热并充以 5%～10% CO_2 的 DMEM/HEPES 中。揭开 96 孔板的盖子，在 CO_2 培养箱中，37℃孵育 10 min。
4. 吸出 BSA 溶液，用 100 μl DPBS 清洗每个孔。
5. 如果要检测某种细胞在一种黏附分子上的伸展情况，就在相应的孔中先加入 50 μl DPBS，然后再加入 50 μl 细胞悬液；如果要观察外源性试剂（如抗体、肽类等）对细胞伸展的影响，则先加入 2 倍浓度的溶于 DPBS 的外源性试剂，然后再加入 50 μl 细胞悬液。在后一种情况下，也应该在 1 个孔中加入 50 μl DPBS 和 50 μl 细胞悬液

作为对照。揭开 96 孔板的盖子，在含有 5%～10% CO_2 的培养箱中，37℃孵育60～90min。

6. 吸出培养液，紧贴孔壁向每孔加入 100μl 5%（w/v）戊二醛以固定细胞，室温孵育 30 min。
7. 吸出固定液，将细胞置于 200 μl CMF-DPBS/NaN_3 中，可在 4℃保存数周（注意防止液体蒸发）。
8. 在每孔中加入足量的 CMF-DPBS/NaN_3，使孔内液体在表面张力作用下稍稍凸出于孔的顶部，然后在 96 孔板的上面小心放置适当大小的玻璃盖玻片。
9. 使用倒置相差显微镜，随机选择 3 个不同的视野，每个视野计数 100 个细胞，计算每孔中伸展细胞的比例。可以利用带有网格线的目镜帮助选择与计数细胞，以避免重复计数。采用特定的形态学指标来鉴定细胞是否伸展。例如，在细胞核的四周可以看到较暗的细胞体和细胞质则可以看作是伸展的细胞。

基本方案 2　附着试验

材料（带√项见附录 1）

感兴趣的黏附分子或结合惰性分子的肽类（支持方案）
√ Dulbecco's PBS（DPBS；Life Technologies）
√ 10 mg/ml 热变性的 BSA 溶液
感兴趣的细胞，在使用之前传代培养至 24 h 以后
含有 25mmol/L HEPES 的 Dulbecco's modified Eagle medium（DMEM/HEPES；Life Technologies；见溶液配方），预热至 37℃并充以 5%～10%（v/v）CO_2
2 倍浓度的溶于 DPBS 的外源性试剂（如抗体、肽类）
5%（w/v）戊二醛（用水稀释 50%的储备液而成）
√ 0.1%（w/v）结晶紫溶液
10%（v/v）乙酸
96 孔组织培养微量滴定板（Costar，Dynex Technologies）
吸引器
15ml 聚丙烯试管
切除尖端的移液器吸头
可读取微量滴定板的酶标仪

1. 将黏附分子用 DPBS 稀释至 1～20 μg/ml。在 96 孔组织培养微量滴定板的每个孔中加入 100 μl 黏附分子稀释液。准备足够的孔以保证每个试验能重复 3 或 4 个孔。预留出足够的空白孔，以测定在 3 种细胞浓度下 100%附着的情况，以及结晶紫与塑料的本底结合情况。室温孵育 60 min 或 4℃过夜。

   包被孔板的黏附分子的浓度与以下一些因素有关，如黏附分子的大小、其包被塑料平面的效率、细胞受体对其亲和力的程度等。

   在稀释之前对各种黏附分子的处理要区别对待，例如，一些黏附分子（如纤连蛋

白）最好在 37℃快速融化，而另一些（如层粘连蛋白）则最好在冰上缓慢融化。

2. 吸出液体后，在每个试验孔中加入 200 μl 10 mg/ml 热变性的 BSA 溶液，室温孵育 30 min。同时，封闭那些用来测定结晶紫与塑料结合情况的孔，而不封闭那些用来测定 100％附着情况的孔。

 也可将细胞接种于多聚赖氨酸（poly-L-lysine，见溶液配方）包被的塑料表面以测定 100％附着的情况。

3. 在封闭过程中，准备拟测定的细胞的细胞悬液，并将该悬液移至 15ml 聚丙烯试管中。由于每个孔要重复 3 或 4 次，因此需要准备足够数量的细胞。利用血球计数板（单元 1.1）计数细胞。对成纤维细胞以及类似大小的细胞而言，将细胞以 5×10^5 个/ml的浓度重新悬浮于预热并充以 5％～10％ CO_2 的 DMEM/HEPES 中；对白细胞而言，细胞浓度应为 1×10^7 个/ml。揭开 96 孔板的盖子，在 CO_2 培养箱中，37℃孵育 10 min。
4. 吸出 BSA 溶液，用 100 μl DPBS 清洗每个孔。
5. 为了检测 100％附着的情况，用预热并充以 5％～10％（v/v）CO_2 的 DMEM/HEPES 把细胞悬液分别稀释到原浓度的 20％、50％和 100％。先在没有包被的孔中加入 50 μl DPBS，然后再加入 50 μl 细胞悬液。
6. 如果要检测某种细胞在一种黏附分子上的附着情况，就在相应的孔中先加入 50 μl DPBS，然后再加入 50 μl 细胞悬液；如果要观察外源性试剂（如抗体、肽类等）对细胞附着的影响，则先加入 2 倍浓度的溶于 DPBS 的外源性试剂，然后再加入 50 μl 细胞悬液。在后一种情况下，也应该在 1 个孔中加入 50 μl DPBS 和 50 μl 细胞悬液作为对照。揭开 96 孔板的盖子，在含有 5％～10％ CO_2 的培养箱中，37℃培养育15～20min。

 在附着试验中的孵育时间需要根据细胞类型作出相应的调整，因为不同细胞其黏附至底物的速度有所不同。

7. 向检测 100％附着的孔加入 100 μl 5％（w/v）戊二醛以固定细胞。
8. 通过轻轻拍打 96 孔板，或者使用切除尖端的移液器吸头，以 100 μl DPBS 轻柔地漂洗每孔 1～3 次。

 这一步是附着试验中最为关键的步骤，需要针对每种细胞类型进行优化。

9. 吸出最后一次的漂洗液，向孔中加入 100 μl 5％（w/v）戊二醛以固定已经附着的细胞，室温孵育 20 min（如果必要的话，也可 4℃过夜）。以 100 μl 水清洗每孔，共洗 3 次。
10. 向每孔中加入 100 μl 0.1％（w/v）结晶紫溶液，室温孵育 60 min。
11. 以 400 μl 水清洗各孔，共洗 3 次。
12. 将染料溶于 100 μl 10％（v/v）乙酸中，在轨道式摇床上以 150r/min 室温孵育 5min。
13. 利用可读取微量滴定板的酶标仪，在 570 nm 下检测吸光度值。从试验孔和检测 100％附着孔的测定值中减去结晶紫本底染色值。根据来源于 20％、50％和 100％接种细胞所得到的数值，绘制一条曲线（A_{570}-细胞密度），通过外推法（extrapolation）得到 100％附着时的吸光度值。用这个数值将试验组的数据用附着百分比来表示。

支持方案 制备肽-蛋白结合物

研究表明，许多大分子的黏附蛋白含有一些可以被细胞受体识别的较短的肽序列，这使得我们可以用合成的短肽来检测这些受体的结合位点。MBS（*m*-顺丁烯二酰亚胺苯甲酰基-*N*-羟基琥珀酰亚胺酯）是一种较好的多肽偶联试剂，牛血清白蛋白（BSA）和匙孔槭血蓝蛋白（keyhole limpet hemocyanin，KLH）均为良好的载体蛋白。

材料（带√项见附录1）

6mg/ml 正常兔 IgG（Sigma），溶于 CMF-DPBS（见溶液配方）

3mg /ml 琥珀酰亚胺基-3-（2-吡啶二硫）丙酸酯［*N*-succinimidyl 3-（2-pyridyldithio）propionate，SPDP；Pierce］，溶于乙醇中

√ 不含二价阳离子的 Dulbecco's PBS（CMF-DPBS；Life Technologies）

含有半胱氨酸的固体肽

√ Dulbecco's PBS（DPBS；Life Technologies）

10ml Sephadex G25 柱子（PD-10，Amersham Pharmacia Biotech）

1. 吸取 1 ml 6 mg/ml 正常兔 IgG 至微量离心管中。采用快速注入的方法，加入 0.2 ml 3 mg/ml 的 SPDP，充分混匀。在摇床上室温孵育 30 min。
2. 用 10～20 倍体积的 CMF-DPBS 平衡 10ml Sephadex G25 柱子。
3. 先将兔 IgG/SPDP 混合物加入柱子中，然后加入 CMF-DPBS。弃去第一次的 2.5 ml 洗脱液，收集下一次的 3.5 ml 液体（含有交联化的 IgG）至 1 个试管中。
4. 分装收集的液体（根据要制备的结合物的数量来决定），然后加入 1～2mg 固体的含有半胱氨酸的肽。在涡旋混合器上短暂地振荡混匀，在摇床上室温孵育过夜。
5. 用多次 DPBS（含二价阳离子）透析混合物（见附录 3C），以去除未偶联的多肽。利用标准透析管道系统，在 DPBS（≥1000 倍体积）中，4℃缓慢搅拌透析。每次 DPBS 的透析时间＞3 h。
6. 将样品分装成 100 μl 的小份，储存于－80℃（可无限期保存）。

参考文献：Humphries et al.，1994

撰稿人：Martin J. Humphries

单元 13.2 利用离心力定量测定细胞黏附能力

以下的实验方法可以研究细胞-底物黏附过程中的生物物理学变化，经过适当的改动后也适用于对细胞-细胞黏附的研究。该方法可以定量地测定在 4℃时细胞和底物之间的弱的结合力，因此可以用来测量受体-配体的亲和力。这种方法也可以用来检测能够巩固细胞黏附的 ATP 依赖性过程，以及在与底物结合后涉及细胞骨架的 ATP 依赖性过程。

基本方案　离心细胞黏附试验

材料（带√项见附录1）

溶于PBS的感兴趣的底物分子

40 mg/ml溶于PBS的BSA（Fraction V；Sigma）溶液

√ PBS

不含胎牛血清（FBS）的组织培养基

已经消化下来的细胞，以5×10^5～10×10^5个/ml的浓度悬浮于无钙的生理性溶液中

96孔平底聚氯乙烯（PVC）平板（Falcon）

透明胶带（3M Scotch 375，4.8cm宽；其他类似的透明胶带也可）

微量滴定板支架

低速冷冻离心机（有微孔板转头）

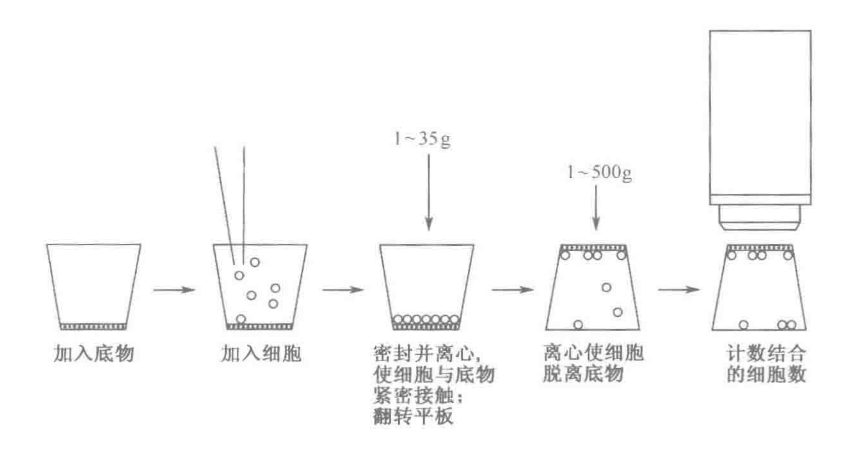


图13.2.1　用光学显微镜观察结果的离心力黏附试验

1. 用剪刀将96孔平底聚氯乙烯平板的四边剪掉，然后把96板切成3块3×8孔的长方形。

   该试验只利用中间的6个孔。这是由于在试验过程中，会将小孔充满培养基直至溢出，以去除气泡，这样一来，会有培养基溢出并进入周围的小孔中。同样，根据各自实验室的条件（如离心机转头、显微镜等）的不同，可以将96孔平底聚氯乙烯平板切成其他形状。

2. 每孔加入50 μl底物溶液；预留出空白孔，准备作100%附着（不加底物，也没有封闭）和本底结合（不加底物）。每个试验至少准备3个重复孔。室温孵育约30 min。

   作为对照，需要明确底物蛋白与孔板底面的附着情况。在本试验开始之前，首先需要确定底物蛋白与孔板底面附着的阈值浓度是多少（相对BSA对照孔，在较低的离心力下），然后以较该阈值浓度为高的底物蛋白浓度进行本试验。

3. 以100μl PBS洗3次。在包被底物的小孔和作本底结合的小孔中（不包括做100%附

着的小孔），加入 50 μl 40 mg/ml BSA 溶液，室温封闭约 30 min。以 100 μl PBS 洗 3 次，将小孔内的液体甩到废液缸，勿使小孔内残留液体。

需要指出的是，本底对照孔并不能结合细胞。BSA 的加入会封闭所有未被底物分子覆盖的区域。比较典型的结果是：细胞与未处理的小孔的结合率为 100%，细胞与小孔的本底结合率<1%。尽管这会因细胞类型不同和应用离心力的大小而有所变化，但在多数情况下可以通过调整实验条件使得细胞与 BSA 封闭的小孔的结合率<1%。这样一来，就可以在一个较宽的范围内检测细胞对特定底物的黏附能力。

如果需要的话，可以在检测 100% 附着情况的小孔（没有底物，未封闭）中加入多聚赖氨酸（poly-L-lysine），从而使细胞结合得更为紧密。

4. 将孔板置于冰上。在所有小孔内加入 100 μl 组织培养基，再加入 100 μl 细胞悬液（5×10^4～10×10^4 个细胞），最后再用 100 μl 组织培养基将所有的小孔充满，使孔内液体在表面张力作用下稍稍凸出于孔的顶部。
5. 在孔板上面轻轻覆上透明胶带，把孔板放在微量滴定板支架上。用橡皮滚碾压，从一侧开始将试验孔中多余的液体挤出至邻近的空孔中。向下按压胶带，使其黏着于小孔周围的 PVC 上。避免小孔中产生气泡。

   在用胶带缠绕密封 PVC 平板时，需要有一个牢固的支撑物。微量滴定板支架是一个橡胶或金属模块，在用胶带密封 PVC 平板时起支持作用。

   如果密封效果好的话，每一个小孔应该密闭且完全充满液体；在约 500 *g* 的离心力作用下，可以保持不渗漏。在密封过程中，会有一些细胞的丢失，但由于在本试验中所采用的计数方法设置了对照，这并不会给试验结果带来误差。
6. 以低速冷冻离心机，用微孔板转头于 4℃ 35 *g* 离心约 3 min，使细胞与底物紧密接触。
7. 备选步骤：如果想测定细胞黏附时的巩固黏附过程，可以将该平板（含有与底物接触的细胞）移至 37℃水浴放置一定的时间。

   在 37℃水浴孵育时可能会产生气泡。为了避免气泡的产生，可以在 37℃水浴孵育结束后才加入最后一次的 100 μl 组织培养基，然后密封平板。
8. 将平板翻转过来，以颠倒的方式用微孔板转头离心细胞，在合适的速度下离心 5 min。保持颠倒的位置，将平板置于冰上。

   此时，在一定强度的离心力作用下，如果细胞不能牢固地黏附于底物，就会从平板上脱落下来。显然，在这一步中有很多可控制的影响因素，如 37℃水浴孵育的时间长短、细胞脱落的比率、离心力大小、巩固黏附的比率等。
9. 将平板置于复式显微镜的载物台上，利用 10× 物镜计数细胞。从与底物结合的细胞数中减去与本底结合的细胞数，以 100%附着的对照孔作为参照，计算出细胞与底物结合的百分比。

   计数细胞最简单的方法是把小孔底部拍照记录，然后通过手动计数或者计算机软件自动计数的方法来得到视野中的细胞数量。

参考文献：Lotz et al.，1989；McClay et al.，1981

撰稿人：David R. McClay and Philip L. Hertzler

单元 13.3　依赖钙黏素的细胞-细胞黏附

细胞-细胞黏附的机制可以分为两种，即钙离子依赖性体系（Ca^{2+}-dependent system，CDS）和钙离子非依赖性体系（Ca^{2+}-independent system，CIDS），而钙黏素（cadherin）则是形成钙离子依赖性细胞-细胞黏附的主要成分。通常，这两种黏附机制在一个细胞中同时存在，因此如果想对细胞黏附作准确的分析，必须将这两种黏附机制区分开来。

研究策略

在由多细胞组成的固体组织中，细胞通过各种各样的细胞-细胞连接（如紧密连接、黏着连接、桥粒、缝隙连接等）和多种具有不同功能的细胞表面分子联系在一起。这些具有复杂的结构和分子组成的细胞黏附体系可以被分为 CDS 和 CIDS。我们可以通过不同的胰蛋白酶（trypsin）的处理来选择性地从细胞表面分别（或同时）去除这两种黏附体系。例如，CDS 对胰蛋白酶的敏感性很高（在胰蛋白酶的浓度很低时也是一样），但它因 Ca^{2+} 的存在而可以耐受蛋白水解酶（protease）的消化。与之相反，如果要去除 CIDS，只有在相对较高浓度的胰蛋白酶的作用下才能实现，而在通常情况下，Ca^{2+} 并不能抑制这种蛋白水解作用。此外，如果用不含 Ca^{2+} 的、高浓度的胰蛋白酶来处理细胞，则会同时抑制这两种黏附体系。

每种类型的钙黏素赋予了细胞特定的黏附性能。我们可以把表达不同类型钙黏素的细胞混合起来，来研究钙黏素的特性。钙黏素与胞浆蛋白-连环蛋白（catenin）联系密切，这种联系对钙黏素的活性是必需的。基于这种分子联系，不论是影响钙黏素还是连环蛋白，都会改变钙黏素的活性。

基本方案 1　短期聚集培养

分散开来的细胞在短时间的培养后，可以重新聚集成团。如果想测定某种黏附分子的活性，且假定这种黏附分子在胰蛋白酶处理后能够保持其在细胞表面上的完整性，那就可以考虑使用本试验方法。但在本方法中不会考虑黏附分子在胰蛋白酶消化后的生理性恢复。

材料（带√项见附录 1）

√1%（w/v）BSA

√ HCMF（见溶液配方）

感兴趣的细胞（见支持方案 1～3），对细胞系：以 0.5×10^5～1×10^5 个/ml 的浓度重新悬浮于冰冷的 HCMF 中；对胚胎早期神经元：以 2×10^6～5×10^6 个/ml 的浓度重新悬浮于冰冷的 HCMF 中

√ 100 mmol/L $CaCl_2$

8% (w/v) 多聚甲醛，溶于 HCMF
24 孔组织培养板 (Falcon)
旋转摇床 (New Brunswick Scientific，Model G2)
√ BSA 包被的巴斯德吸管

1. 预包被 24 孔组织培养板，即每孔加入 0.5 ml 1% (w/v) BSA，4℃过夜。在使用之前以 HCMF 清洗小孔数次。
2. 把 24 孔板置于冰上，每孔加入 0.5 ml 细胞悬液。再加入 56 μl 100 mmol/L $CaCl_2$ (终浓度为 1 mmol/L)，使 TC 处理后细胞的钙黏素受到激活。在对照孔中加入等量的水，比较 Ca^{2+} 的效应。

   需要时，也可以同时加入其他物质，如抗体 (表 13.3.1) 和抑制剂。

   从损伤细胞中释放出来的 DNA 会干扰细胞的聚集过程 (见支持方案 2)。为了避免这种干扰，可以在聚集培养基中加入 DNase I (至 10μg/ml 终浓度) 和 $MgCl_2$ (至1 mmol/L终浓度)。DNA 酶 (DNase) 的存在对于准确检测细胞的自然聚集情况是很关键的。Mg^{2+} 可能激活整合素 (integrins)，但通常这种效应在钙黏素试验中可以被忽略。而钙黏素本身对 Mg^{2+} 不敏感。

表 13.3.1 可购买到的针对钙黏素和连环蛋白的单克隆抗体

抗　原	克　隆	抑制效应[a]	供应商[b]
Cadherins			
Xenopus C-cadherin	6B6		DSHB
Canine E-cadherin	Rr1		DSHB
Human E-cadherin	HECD-1，SHE78-7	++	Takara，Zymed
Human E-cadherin			Transcution Labs
Human E-cadherin			Chemicon
Human E-cadherin	6F9		ICN，BIB，PGN
Human E-cadherin	67A4		Cosmo Bio
Mouse E-cadherin	ECCD-1	++	Takara，Zymed
Mouse E-cadherin	ECCD-2	−	Takara，Zymed
Mouse uvomorulin (E-cadherin)	DECMA-1		Sigma
Xenopus E-cadherin	5D3，8C2		DSHB
Rat K-cadherin (cadherin-6)			Transduction Labs
Chicken N-cadherin	NCD-2	++	Takara，Zymed
Chicken ACAM (N-cadherin)	FA-5，GC-4，ID-7.2.3		Sigma
Human P-cadherin	NCC-CAD-299	++	Takara，Zymed
Human P-cadherin			Transduction Labs
Mouse P-cadherin	PCD-1	++	Takara，Zymed
Rat R-cadherin			Transduction Labs
Human VE-cadherin	BV6		BLD，BIB

续表

抗　原	克　隆	抑制效应[a]	供应商[b]
Human cadherin-5			Transduction Labs
Human cadherin-5	TEA1/31		Cosmo Bio
Pan cadherin	CH-19		Sigma
Chicken LCAM	7D6		DSHB
Catenins[c]			
α-catenin			Transduction Labs
β-catenin	CAT-5H10		Zymed
β-catenin			Transduction Labs
β-catenin	15B8，6F9		Sigma
Plakoglobin（γ-catenin）	PG-11E4		Zymed
Plakoglobin（γ-catenin）			Transduction Labs
Plakoglobin（γ-catenin）	15F11		Sigma
Plakoglobin（γ-catenin）	PG5.1		PGN

a. 抑制效应仅指经作者本人测试得到的结果。其他的抗体请参考原始文献。

b. BIB，Boehringer Ingelheim Bioproducts；BLD，BioLine Diagnostics；ICN，ICN Biomedicals；DSHB，Developmental Studies Hybridoma Bank；PGN，Progen Biotechnik GmbH. 地址请参见附录 4。

c. 由于多数抗体可以识别多个种属的连环蛋白，因而省略了连环蛋白的种属名称。

3. 将 24 孔板置于旋转摇床上，以 80 r/min 的转速在 37℃孵育 30 min 至 2h。每隔 30min 用倒置显微镜监测细胞的聚集情况（如果要在 37℃孵育 30 min，则可缩短间隔时间），注意不要扰动小孔中央细胞的聚集。

   细胞会很快向小孔的中央集中并在此聚集。TC 处理的细胞在有 Ca^{2+} 存在时，会在 10 min 内开始聚集。LTE 处理的细胞在无 Ca^{2+} 存在时发生聚集。TE 处理的细胞在上述的两种情况下通常都不会发生聚集。

4. 把 24 孔板置于冰上。

   使细胞冷却可以终止钙黏素介导的细胞聚集。而对 LTE 处理的细胞而言，Ca^{2+} 非依赖性的细胞聚集可能仍在继续。

5. 每孔加入等体积的 8%（w/v）多聚甲醛，混合后，冰上孵育 15min。
6. 轻柔地摇晃 24 孔板，用 BSA 包被的巴斯德吸管吸取部分细胞悬液（或全部细胞悬液），用血球计数板或自动细胞计数装置计数细胞聚集物和单个细胞的数量。计算 N_t/N_0，其中，N_t 是在一定的孵育时间 t 内全部的细胞颗粒数量（包括细胞聚集物和单个细胞）；而 N_0 是细胞悬液中的总体细胞数目（见支持方案 1～3，以及其中列出的材料）。

备择方案　长期聚集培养

在长期聚集培养时，通过将细胞置于富含营养的培养基（而不是 HCMF）中，可以把培养细胞的时间延长至数小时至数天。

附加材料（其余见基本方案 1）

1%（w/v）琼脂（如 Noble agar，Difco），溶于标准培养基中

感兴趣的细胞（见支持方案 3），按照 $0.5\times10^5\sim1\times10^5$ 个/ml 的浓度（细胞系），或 $2\times10^6\sim5\times10^6$ 个/ml 的浓度（胚胎早期神经元），悬浮于含 10% FBS（见溶液配方）的标准细胞培养基（如含添加物的 DMEM；见溶液配方）中

1. 向 24 孔组织培养板（或培养皿）中倾注最少量的 1%（w/v）琼脂，使之覆盖全部底面。静置，使琼脂凝固成胶冻状。
2. 向琼脂包被的小孔中加入感兴趣的细胞。根据需要，孵育一定的时间。如果细胞培养基使用的是 $NaHCO_3/CO_2$ 缓冲系统，则把 24 孔组织培养板置于摇床上在含 5%～10%CO_2 的培养箱中孵育。
3. 固定细胞，计算细胞的聚集程度（见基本方案 1）。

基本方案 2　混合细胞聚集培养

为了评价两种细胞群是否能够互相黏附，可以将它们混合后，在上述的一种培养体系中使其发生重新聚集。通过分析得到细胞聚集物，判断这些细胞在聚集发生后是否被分离开来。

材料（带√项见附录 1）

培养的细胞

含10% FBS（见溶液配方）的标准细胞培养基（如含添加物的 Dulbecco's modified Eagle medium，DMEM；见溶液配方）

荧光染料：如 3 mg/ml 的溶于二甲基亚砜（DMSO）的 DiO（3，3′-dioctadecyloxacarbocyanine perchlorate），Cell Tracker（Molecular Probes），PKH26（ZYNAXIS），或 Fluoro-gold（Fluorochrome）

√ HEPES 缓冲液

8%（w/v）多聚甲醛，溶于 HCMF（见溶液配方）

基于甘油的封片液，含有防荧光衰减剂（如 1 mg/ml 的对苯二胺 *p*-phenylenediamine，溶于 90%甘油）

√ BSA 包被的微量离心管

1. 将一种细胞用荧光染料标记，或把两种细胞用不同颜色的荧光染料标记。例如，将细胞单层置于含 15 μg/ml DiO 的标准细胞培养基中，37℃过夜培养，即得到荧光标记的细胞，然后用 HEPES 缓冲液洗细胞 3 次。把细胞单层分散为单个细胞（见支持方案 1～3），然后重新悬浮。
2. 计数细胞（单元 1.1），利用下一步细胞聚集培养所使用的培养基调整细胞密度。将两种分散的细胞以 1∶1 的比例混合，在合适的条件下进行孵育，使之聚集。

3. 在每孔中加入等体积的 8%（w/v）多聚甲醛，4℃固定细胞 30min。
4. 将各个孔中的内容物转移至 BSA 包被的微量离心管中，700*g*，4℃离心样品 1min。
5. 弃去上清，以 HEPES 缓冲液轻柔地洗细胞 3 次。
6. 将细胞移至玻璃载玻片上，用最少量的基于甘油的封片液（含有防荧光衰减剂）封片。
7. 在荧光显微镜下分析细胞聚集物的形成情况。

支持方案 1　以 TC 处理成纤维细胞使细胞解离

材料（带√项见附录 1）

感兴趣的细胞，细胞密度达到 50%左右（半汇合状态）

√ HMF

√ TC 溶液

√ 0.5%（w/v）大豆胰蛋白酶抑制剂溶液

√ HCMF，冰上预冷

√ BSA 包被的 10ml 试管以及巴斯德吸管

1. 在试验前 1～2 天接种细胞，使细胞在试验当天形成汇合度为 50%的单层。为了确认 TC 处理的作用，还需准备细胞以供用 TE（见支持方案 3）处理。以 HMF 洗细胞 3 次。
2. 弃去 HMF，在洗过的细胞上加入 TC 溶液（如在 5cm 的培养皿中约加入 4 ml TC 溶液）。在旋转摇床上，37℃孵育 15～30 min，然后在倒置显微镜下观察细胞的状况。
3. 把细胞转移至 BSA 包被的 10ml 试管中。如果需要的话，可以用 BSA 包被的巴斯德吸管冲洗仍贴壁的细胞，并收集之。4℃，700*g* 离心 3～4 min，弃去上清。
4. 向细胞沉淀加入 100 μl 0.5%大豆胰蛋白酶抑制剂溶液，接着加入 5 ml 冰冷的 HCMF。以 BSA 包被的巴斯德吸管短暂地吹打细胞沉淀，使之重新悬浮，然后再次离心。抽吸并弃去上清液。
5. 向细胞沉淀中加入 5 ml 冰冷的 HCMF，轻柔地吹打使细胞沉淀散开。4℃，700*g* 离心 3～4 min，弃去上清。重复本步骤一次。
6. 将细胞重新悬浮于 2～5 ml 冰冷的 HCMF 中，用 BSA 包被的巴斯德吸管反复吹打细胞，从而得到彻底解离的细胞。
7. 计算细胞浓度（单元 1.1），4℃，700*g* 离心 3～4 min，弃去上清。将细胞按照 0.5×10^5～1×10^5 个/ml 的浓度重新悬浮于冰冷的 HCMF 中。在冰上保存，并尽快使用。

支持方案 2　以 TC 处理胚胎细胞使细胞解离

本方案很适用于在胚胎早期的神经组织和成纤维细胞性组织中分离细胞。对大多数

组织（如胚胎早期脑组织）而言，可以将 Ca^{2+} 的浓度提高至 10mmol/L 而使细胞的钙黏素得到最大限度的保护，同时还不影响细胞聚集的形成。

附加材料（同见支持方案 1；带√项见附录 1）

胚胎
√ HEPES 缓冲液，冰上预冷
DNase I
1mol/L $MgCl_2$
√ BSA 包被的 5cm 有盖培养皿

1. 从胚胎中切取组织，置于冰冷的 HEPES 缓冲液中。在 HEPES 缓冲液中将组织切成小块。以最少量的 HEPES 缓冲液收集组织块，转移至 BSA 包被的 5cm 有盖培养皿的边缘，用锋利的剪刀把组织剪碎。
2. 加入 4～5 ml 的 TC 溶液，在旋转摇床上，37℃孵育 20～30min。
3. 用 BSA 包被的巴斯德吸管轻轻吹打细胞悬液，使组织分散开，用倒置显微镜观察分散情况。如果有黏稠的 DNA 存在，则先后向细胞悬液中加入过量的大豆胰蛋白酶抑制剂（加入 1/10 体积的 0.5％的大豆胰蛋白酶抑制剂溶液）、终浓度达 10 μg/ml 的 DNase I 以及终浓度达 10mmol/L 的 $MgCl_2$。在 37℃孵育（勿摇动），直至这种黏稠物完全消失（需数分钟时间）。
4. 将细胞悬液转移至 BSA 包被的 10ml 试管中，洗细胞数次（见支持方案 1，步骤3～5）。
5. 计数并重新悬浮细胞。例如，将胚胎脑组织来源的细胞的浓度调整至 2×10^6～5×10^6个/ml。

支持方案 3　以 LTE 或 TE 处理细胞使细胞解离

不论是以低浓度的胰蛋白酶（LTE）处理细胞，还是以高浓度的胰蛋白酶（TE）处理细胞，其消化液中均含有 1 mmol/L 的 EDTA，这都是为了得到缺乏钙黏素的细胞。对于 LTE 处理的细胞，CIDS 仍然保持活性；而对于 TE 处理的细胞，则钙黏素和 CIDS 都失活了。然而，有些组织（如上皮组织）的细胞不会因 TC 的处理而完全解离。这时，用 TE 处理就成了唯一的获得单个细胞的方法。

附加材料（同见支持方案 1 和 2；带√项见附录 1）

√TE 溶液
√ LTE 溶液

1a. 如果是培养的细胞：用 HCMF 洗细胞 3 次。
1b. 如果是胚胎组织：用 HCMF 漂洗组织后，转移至 5cm 的用 BSA 包被的有盖培养皿中，以备胰蛋白酶消化。

2. 向培养皿中加入 4～5 ml LTE 或 TE 溶液，在旋转摇床上，37℃孵育 15～30min。

   对大多数细胞而言，用 0.0001%（w/v）的胰蛋白酶即可得到满意的消化结果；对胚胎脑组织而言，用 0.0005%（w/v）的胰蛋白酶较为合适。

3. 用倒置显微镜观察细胞。如果是源于胚胎脑组织的细胞，必要时可以用相应的方法消化 DNA 黏稠物（见支持方案 2）。
4. 将含细胞的液体转移至 BSA 包被的 10ml 试管中，洗细胞数次（见支持方案 1，步骤 3～5）。
5. 计数细胞并重新悬浮细胞，如果是细胞系，将细胞浓度调整至 0.5×10^5～1×10^5 个/ml；如果是胚胎细胞，则将细胞浓度调整至 2.5×10^6 个/ml。

基本方案 3　检测钙黏素和连环蛋白

如果想了解某种细胞的钙黏素表达或活性情况，使用下面的试验方法可能会得到一些有价值的线索。

形态学检测

观察低密度培养时细胞集落的形态学特征。如果钙黏素有活性，则细胞会在其边缘与其他细胞形成紧密联系。如果细胞的钙黏素没有活性，那些单个的细胞会表现为独立存在（即没有与周围细胞形成紧密接触）。然而，当钙黏素失活的细胞汇合（confluence）度达 100%时，它们可能也会暂时形成细胞单层样的结构，有的时候很难与钙黏素活化的细胞相区别。但是，如果细胞继续增殖且钙黏素仍无活性，则过度增长的细胞会受到排斥，这些受排斥的细胞可能停留在细胞层上面，并呈现出圆球形。而这种现象在钙黏素活化的细胞所形成的细胞单层中则不会出现，即使在细胞密度很高时这些细胞仍保持紧密的相互联系。

检测连环蛋白的定位

可以利用荧光标记的针对 β-连环蛋白、α E-连环蛋白或 α N-连环蛋白（单元 5.3；表 13.3.1）的抗体对单层细胞进行免疫染色。如果其中一种分子集中存在于细胞相互接触的部位，则表明在此处存在某种类型的钙黏素，并且与连环蛋白有共定位（colocalization）。

测定 Ca^{2+} 依赖性胰蛋白酶敏感性

用 TC（见支持方案 1 或 2）和 TE（见支持方案 3）处理细胞。如果用 TC 处理后，细胞形成紧密联系的细胞团从培养皿上脱落下来；而用 TE 处理后表现为分散的单个细胞，这就表明这些细胞肯定含有某种钙黏素。

检测钙黏素的表达

如果有钙黏素的抗体（见表 13.3.1），可以作免疫印迹（单元 7.7）或免疫染色（单元 5.3）。如果钙黏素是有活性的，则其免疫染色的信号应该集中于细胞相互接触的

部位。需要指出的是，多数的钙黏素抗体有一定的种属特异性。

如果免疫学方法的结果不理想，也可尝试 RT-PCR（反转录 PCR）技术，用合适的引物来选择性扩增特定的钙黏素基因片段。可以参考 Suzuki 等（1991）和 Sano 等（1993）文献中的 PCR 引物序列。

基本方案 4　抑制钙黏素的功能

目前，至少有 3 种方法可以封闭钙黏素的活性：去除 Ca^{2+}、利用抑制性抗体、表达显性负突变钙黏素的质粒（dominant negative constructs）。

通过去除 Ca^{2+} 发挥抑制作用

去除 Ca^{2+} 是封闭钙黏素的最有效的方法。对大多数细胞类型而言，钙黏素在 Ca^{2+} 的浓度低于 0.1 mmol/L 时没有活性。将细胞与 EGTA 或 EDTA（如 1 mmol/L）共同孵育后，可以大大促进 Ca^{2+} 的去除，并且在 37℃时，在 10min 内即可观察到细胞的解离。任何经由这类螯合剂处理的细胞会聚拢变圆，并与周围细胞形成明显的缝隙。然而，需要强调的是，许多细胞（尤其是上皮细胞）并不会因为单纯的螯合剂处理而使细胞之间完全分离开。这些细胞常常通过更为精细的机制来维持其紧密的细胞连接。普通的机械力也不能破坏这种抗螯合剂的细胞连接。这种细胞连接的分子组成尚不完全清楚，只有 TE 处理才可以破坏它们。

通过抗体发挥抑制作用

许多针对钙黏素的细胞外结构域的抗体可以抑制钙黏素的黏附活性。如果用此种抗体处理形成单层的培养细胞，可以观察到细胞的形态学变化。这种变化不像去除 Ca^{2+} 那样强烈，但细心的观察者会发现：抗体处理的细胞和未处理细胞之间存在明显差别。更重要的是，在抗体处理的细胞之间经常看到有缝隙存在。这些变化通常在加入抗体数小时后即可观察到。需要指出的是，如果想观察这种现象是否能出现，不应该使用高密度的培养细胞，这是由于高密度的培养细胞很难观察到细胞的形态学变化。当以钙黏素的抗体处理立体的组织时，则可以观察到单个细胞聚拢变圆，以及组织致密性的降低。

对于钙黏素的抗体，有一些要点需要引起注意：①在可以购买到的钙黏素的抗体中，只有一部分具有封闭活性（表 13.3.1）。②许多抗体有一定的种属特异性。③通常，一个细胞表达多种类型的钙黏素。如果想完全抑制一个细胞的钙黏素介导的细胞黏附，就必须封闭所有类型的钙黏素。尽管如此，如果用抗体封闭了细胞表达的主要类型的钙黏素，就足以引起细胞的形态学变化。

通过显性负突变钙黏素的质粒发挥抑制作用

有两组含有钙黏素 cDNA 质粒的产物可以发挥显性的负作用（dominant negative effect）。一组（ΔN）编码了截短的细胞外结构域和完整的细胞内结构域。这种分子本身不能作为黏附分子起作用，因为它们缺乏完整的细胞外结构域。然而，它们可以正常

地与细胞骨架发生联系。基于此，ΔN 分子和内源性的完整钙黏素竞争性地与胞内成分发生相互作用，从而干扰了内源性钙黏素的黏附活性。ΔN 分子还可以非特异性地抑制多种类型的钙黏素的功能。

另一组显性负突变钙黏素是 ΔC，它含有完整的细胞外结构域和截短的细胞内结构域。同样，ΔC 的编码产物也不能作为黏附分子起作用。它可能会干扰内源性钙黏素细胞外结构域的嗜同性相互作用。和 ΔN 有区别的是，由于每种类型的钙黏素都有独特的细胞外结构域序列，ΔC 可以用来特异性地阻断特定类型钙黏素的功能。在爪蟾胚胎中曾经成功地应用了 ΔC，但在细胞系中则未见报道，这可能是因为需要过量的突变分子才能完全地拮抗内源性的完整钙黏素。

基本方案 5　在钙黏素缺乏或连环蛋白缺陷的细胞系中，恢复钙黏素的活性

钙黏素功能受损的细胞系对研究钙黏素介导的细胞黏附机制很有帮助。有很多方法可以导致钙黏素功能损失，如钙黏素或连环蛋白基因的缺失、突变或表达下降等。有些细胞系则根本不表达钙黏素，如 L、Neuro 2a、S180 等。α-连环蛋白缺失的细胞系有 PC9 和 HCT-8/R1。HSC39 则表达截短的 β-连环蛋白基因片段。在一些细胞系中，尽管存在所有已知的钙黏素黏附体系的组分，但仍然表现为钙黏素的功能失活。这种对钙黏素功能的阻断可能是基于生理学的机制。钙黏素功能不良多见于癌细胞系。在大多数这种癌细胞系中，细胞-细胞黏附，以及细胞-底物黏附都有所减弱，细胞像悬浮细胞一样生长而不形成紧密的细胞团。如果发现某种细胞系呈现单个细胞样的生长，那么该细胞系很可能由于上述的某种机制导致了细胞钙黏素的功能失活。

在钙黏素缺乏或连环蛋白缺陷的细胞系中，通过向细胞中转染编码受累蛋白产物的 cDNA，就可以恢复钙黏素的活性。由于转染成功的细胞形态会发生明显变化，从分散型变为黏附型，这样就可以通过显微镜观察来选择阳性细胞克隆，因而对转染成功的细胞克隆的挑选过程相对容易。但是，从另一方面讲，仅仅利用简单的转染钙黏素或连环蛋白 cDNA 的方法，并不能恢复生理情况下被阻断的钙黏素功能。

参考文献：Barth et al.，1997；Nose et al.，1988；Takeichi，1977，1988，1995

撰稿人：Masatoshi Takeichi and Shinichi Nakagawa

单元 13.4　分析整合素依赖性黏附

基本方案 1　在基于细胞的试验中分析整合素依赖性黏附

材料（带√项见附录 1）

感兴趣的黏附分子

√ Dulbecco’s PBS（DPBS；Life Technologies）

√ 10 mg/ml 热变性的 BSA 溶液

感兴趣的细胞

DMEM/HEPES：含有 25mmol/L HEPES 的 Dulbecco's modified Eagle medium (Life Technologies；见溶液配方)，预热至 37℃，充以 5%～10% (v/v) CO_2

抑制剂：针对整合素的单克隆抗体（见表 13.4.1）或肽类，以适当浓度溶于 DPBS

96 孔组织培养微量滴定板

表 13.4.1　适用于细胞黏附试验的单克隆抗体

整合素亚单位[a]	配体[b]	单克隆抗体[c]	有无封闭能力	供应商
α1	COL/LN	5E8D9	有	Upstate Biotechnology
		TS2/7	无	Serotec
α2	COL/LN	Gi9	有	Beckman Coulter
		16B4	无	Serotec
α3	FN/COL/LN	P1B5	有	Chemicon
		M-Kid2	无	Beckman Coulter
α4	FN/VCAM-1	HP2/1	有	Serotec
		44H6	无	Serotec
α5	FN	JBS5	有	Serotec
		VC5	无	Pharmingen
		mAb 16	有	K. M. Yamada[d]
α6	LN	GoH3	有	Serotec
		4F10	无	Serotec
α9	TN	Y9A2	有	Chemicon
β1		4B4	有	Beckman Coulter
		K20	无	Beckman Coulter
		mAb 13	有	K. M. Yamada[d]
αL	ICAM-1，-2，-3	MHM 24	有	DAko
		BV17	无	Chemicon
αM	FG，ICAM-1	ICRF 44	有	Serotec
		LM11	无	Chemicon
β2		MHM 23	有	Dako
αV	VN/FN/FG/TSP	69-6-5	有	Beckman Coulter
		P3G8	无	Chemicon
β3		SZ21	有	Beckman Coulter
		PM6/21	无	Serotec
β4		ASC-3	有	Chemicon
		450-90	无	Serotec
β5		P1F6	有	Life Technologies

a. 注意：β1 与 α1-α9 相关联；β2 与 αL 和 αM 相关联；β1，β3 和 β5 与 αV 相关联；β4 与 α6 相关联；β2 整合素仅在白细胞中表达，而大多数的其他的整合素都是广泛表达的。

b. COL，collagen；FG，fibrinogen；FN，fibronectin；ICAM，intercellular adhesion molecule；LN，laminin；TN，tenasein；TSP，thrombospondin；VCAM，vascular cell adhesion molecule；VN，vitronectin。

c. 所有的单克隆抗体（除了 GoH3、mAb 16、69-6-5 和 mAb 13)，都是小鼠抗人的抗体。GoH3、mAb 16、69-6-5 和 mAb 13 是大鼠抗人的抗体。可以向表中提及的供应商查询其他种属的抗体。抗体应该分装后储存于 -70℃。

d. 遵循材料转移协议，来源于 K. M. Yamada，National Institutes of Health。

1. 用 DPBS 稀释感兴趣的黏附分子至合适的浓度，包被 96 孔板（使之能够达到 50%～70%的最大细胞黏附率）；然后再以 10 mg/ml 热变性的 BSA 溶液封闭 96 孔板（见单元 13.1，基本方案 1）。
2. 准备感兴趣的细胞，将细胞以 2×10^5 个/ml 的浓度，悬浮于预热的充以 5%～10% CO_2 的 DMEM/HEPES 中。将细胞转移至开口的试管中，在 CO_2 孵箱中 37℃孵育 10 min。

3a. 细胞伸展试验：弃去 96 孔板中的 BSA 溶液，以 100 μl DPBS 清洗各孔，再加入 50 μl DPBS（含有 2 倍于终浓度的抑制剂）。然后在每孔中加入 50 μl 细胞悬液。

3b. 细胞附着试验：将一部分细胞悬液与等体积的 DPBS（含有 2 倍于终浓度的抑制剂）混合，37℃孵育 15～30 min。弃去 96 孔板中的 BSA 溶液，以 100 μl DPBS 洗涤各孔，再向每孔加入 100 μl 细胞/抑制剂混合物。

根据作者经验，10 μg/ml（终浓度）的单克隆抗体，或 1∶500 稀释的腹水可以达到最大的抑制效应。需要指出的是，单抗的最大抑制浓度需要通过一系列从低浓度到高浓度的梯度抑制试验才能确定。还有一点也很重要，即单克隆抗体中不应含有叠氮化物。

4. 孵育，固定，分析伸展试验（单元 13.1，基本方案 1）或附着试验（单元 13.1，基本方案 2）的结果。

在检测一种单抗在细胞伸展和附着过程中的作用时，设置恰当的对照是很重要的。最好的对照是经过测试对整合素没有抑制作用的特异性单抗，如 K20 对整合素 β1（见表 13.4.1）。但是如果条件有限，也可采用以下类型的对照：①不加单抗，只加入 DPBS；②未免疫小鼠或大鼠的 IgG 或腹水；③源于同一种属的无关单克隆抗体。在使用合成肽进行试验时，应同时使用对照肽（如 GRGES）以排除毒性和非特异性反应。

如果几种不同的整合素单抗都有部分抑制效应，则可以用 2 种或 2 种以上的单抗组合来分析每种整合素对细胞黏附的相对促进作用。

基本方案 2　固相分析整合素-配体相互作用

材料（带√项见附录 1）

纯化的整合素（见支持方案 1）
√ Dulbecco's PBS (DPBS; Life Technologies)
√ 封闭液
生物素标记的配体（见支持方案 3）
√ 结合缓冲液
ExtrAvidin 过氧化物酶试剂（Sigma）
√ ABTS 试剂
√ 2%（w/v）SDS，溶于水
ELISA 平板（如 Immulon 1B 或 4HBX；Dynex Technologies）

塑料薄膜（如 Nescofilm、Parafilm 或 Saran wrap）
多道移液器
21G 皮下注射针头
带侧臂的三角烧瓶
可读取微量滴定板的酶标仪

1. 用 DPBS 稀释纯化的整合素至 1 μg/ml。向 ELISA 平板的小孔中加入稀释后的整合素（每孔 100 μl；通常作 4～6 个重复孔）。预留出一组空白小孔检测配体与 BSA 的结合情况。将平板用塑料薄膜包好，室温放置过夜。如果需要的话，在 4℃可以储存 1 周。
2. 用多道移液器在含有整合素的小孔中加入 25 μl 封闭液，用连接真空抽吸装置的 21G 皮下注射针头（针头通过管道与带侧臂的三角烧瓶相连，三角烧瓶则连接至抽真空器）吸去液体，或者将平板翻转过来把小孔内液体甩到废液缸。
3. 用多道移液器向每孔（包括检测配体与 BSA 结合的小孔）加入 200 μl 封闭溶液。室温放置平板 1～3h，吸去（或甩尽）封闭液。
4. 用多道移液器向每孔加入 200 μl 结合缓冲液，然后吸去（或甩尽）结合缓冲液。重复两次。把平板翻转过来，在吸水纸巾上面拍打数次，以去除孔内残留液体。
5. 将生物素标记的配体以适当浓度稀释于结合缓冲液中，取 100 μl 加入每个试验孔中。用塑料薄膜包裹平板，37℃孵育 3h。
6. 从小孔中吸去液体以去除未结合的配体。
7. 以 200 μl 结合缓冲液（见步骤 4）清洗小孔 3 次。然后把平板翻转过来，甩尽孔内残留液体。
8. 按照 1∶500 的比例，以结合缓冲液稀释 ExtrAvidin 过氧化物酶试剂。用连续加样移液器向每孔加入 100 μl 稀释后的 ExtrAvidin 过氧化物酶试剂，室温保持 10～15min。在此期间，准备 ABTS 试剂。
9. 从小孔中吸去液体以去除未结合的 ExtrAvidin 过氧化物酶试剂。以 200 μl 结合缓冲液清洗小孔 2 次，再以 400 μl 结合缓冲液清洗小孔 2 次。然后把平板翻转过来，甩尽孔内残留液体。
10. 用连续加样移液器向每孔加入 100 μl ABTS 试剂。使反应进行至液体颜色呈深绿色（不是黑色；一般需要 10～30 min）。在适当的时候，用连续加样移液器向每孔中加入 100 μl 2%（w/v）SDS 溶液，终止反应。
11. 在可读取微量滴定板的酶标仪上，于 405 nm 处检测吸光度值。
12. 用下面的公式，分别计算配体与整合素结合、配体与 BSA 结合的吸光度值的均值和标准差。如在试验过程中出现问题，请参考表 13.4.2 中的解决方案。

$$\text{净结合的标准差}=\sqrt{(\text{配体与整合素的吸光度值的标准差})^2+(\text{配体与 BSA 结合的吸光度值的标准差})^2}$$

表 13.4.2 在固相黏附试验中可能出现问题的解决方案

问　题	可能原因	解决办法
与 BSA 包被小孔的本底结合很高	对小孔的封闭不完全 配体浓度太高	延长封闭时间（如过夜） 用一系列浓度的配体作测试，以获得最佳的实验条件
某些孔的信号异常地高	洗得不够充分 小孔上部有污染	仔细遵循实验步骤作清洗 将试剂加入小孔中央
实验孔中的信号差别很大	加入平板的整合素没有混匀 加入封闭溶液前已将加入的整合素吸去	在用整合素包被平板时要彻底混合稀释液 在弃去整合素包被溶液之前在小孔中加入封闭溶液 用新的、干净的平板
与 BSA 本底结合相比，信号很低	平板受到污染（如灰尘） 整合素的量不足 配体的浓度太低 配体没有活性	降低整合素的稀释倍数 使用更高浓度的配体 在细胞学试验中检验配体活性

支持方案 1　整合素的纯化

材料（带√项见附录 1）

人的胎盘（来源于当地医院的产科；在产后数小时后即开始处理）

√ 匀浆缓冲液

1%（w/v）Virkon（Merck），溶于水

√ 抽提缓冲液，4℃预冷

Sepharose 4B 树脂（Sigma）

大鼠 IgG-Sepharose 树脂（见支持方案 2）

mAb 13（anti-β1）-Sepharose，mAb 16（anti-α5）-Sepharose（见支持方案 2）

√ 洗涤缓冲液，4℃预冷

√ 洗脱缓冲液，4℃预冷

√ 1mol/L Tris·Cl，pH 8.2（4℃储存 6 个月）4℃预冷

0.1mol/L Tris·Cl，pH 8.3（见溶液配方）/0.1%（w/v）TritonX-100（Ultra grade，Sigma），4℃预冷（4℃储存 3 个月）

磷酸缓冲盐溶液（PBS；用 Life Technologies 的 10×储备液配制），含有 0.5%（w/v）叠氮钠（来自 20% w/v 溶于水的叠氮钠储备液）

√ PBS（Life Technologies）

√ 5×SDS-PAGE 样品缓冲液

6% SDS-聚丙烯酰胺凝胶

大剪刀

搅拌机

Beckman J6-B 离心机，带 JA-10 和 JA-20 转头（或同类的冷冻离心机）

500ml 的聚碳酸酯离心瓶（Nalgene）
50ml 的聚异质同晶体离心管（Nalgene）
Econo-Pac 20ml 的一次性聚丙烯柱子（Bio-Rad）
50ml 带旋盖的聚丙烯离心管（Becton Dickinson Labware）
旋转摇床（Cole-Parmer）
1.6cm×20cm 的 C16 柱子（Amersham Pharmacia Biotech）
蠕动泵
馏分收集器
直径 0.8cm 的 Poly-Prep 2ml 一次性聚丙烯柱子（Bio-Rad）

1. 用大剪刀把胎盘（除去脐带和羊膜）剪成小块，将这些碎块连同 500ml 冷的匀浆缓冲液放入搅拌机中。以中速搅拌胎盘 1 min。将组织匀浆（约 1L）倒入 500ml 的聚碳酸酯离心瓶中，储存于−70℃直至使用（可以存放 2 年）。

   警告： 人胎盘有潜在的生物危险性；在操作过程中应该采取适当的预防措施，如戴乳胶手套、佩戴护目镜、穿实验衣等。搅拌匀浆的过程应该在原代细胞培养操作间进行，任何不慎洒出的匀浆液体都应该用 1%Virkon 处理。离心瓶和离心管在使用后也需要用 1%Virkon 浸泡处理。

   利用培养细胞进行本试验时，一般至少需要 10 ml 密集充填的细胞，而下述的试剂和树脂的体积也应该按比例缩小 2～4 倍。

2. 将冷冻的匀浆取出，于冷藏室（效果较好）或在室温过夜，使之融化。将匀浆液体于 4400*g*，4℃离心 10min，把上清液倒入装有 5L 1%Virkon 的大桶中。用 600 ml 匀浆缓冲液重新悬浮离心得到的沉淀物。以同样的条件再次离心，并按上述方法弃去上清液。
3. 向离心瓶中加入 400 ml 抽提缓冲液，置于冰上 1 h，每隔数分钟剧烈摇动离心瓶，以保证沉淀物的充分悬浮。
4. 将抽提液于 6400*g*，4℃离心 10 min。把上清液移至 50ml 离心管中，于 48 000*g*，4℃离心 30min。
5. 装柱，即将 8 ml 50%的 Sepharose 4B 悬液装入 20ml 的一次性聚丙烯柱子内。然后使步骤 4 中的上清液流过柱子进行过滤，收集穿透液。
6. 在 50ml 带旋盖的聚丙烯离心管内，将穿透液与 8 ml 的 50%大鼠 IgG-Sepharose 悬液混合，在旋转摇床上摇动 2h。通过把液体上样于 20ml 的一次性聚丙烯柱子（利用柱子底部的多孔玻璃滤片发挥过滤作用），去除大鼠 IgG-Sepharose。
7. 在 50ml 的聚丙烯管内，将步骤 6 中的穿透液与 8 ml 的 mAb 13-Sepharose 混合，在旋转摇床上摇动 2 h。将液体上样于 20ml 的一次性聚丙烯柱子中，回收 mAb 13-Sepharose。收集穿透液，储存于 4℃。
8. 将 mAb 13-Sepharose 重新悬浮于洗涤缓冲液，装入 1.6cm×20cm 的 C16 柱子中，利用蠕动泵，用洗涤缓冲液以 10 ml/h 的流速过夜洗柱。
9. 加入洗脱缓冲液，以 45 ml/h 的流速洗 30 min，洗脱整合素。在此过程中，用馏分收集器依次分段收集 2min（1.5 ml）的液体至已加入 0.5 ml 1mol/L Tris・Cl（pH

8.2）的试管中。在洗脱时将二者混合以保证迅速地中和。将分段收集的液体储存于4℃。

10. 立即用20ml 0.1 mol/L Tris·Cl（pH 8.3）/0.1%（w/v）TritonX-100，45 ml/h的流速中和柱子。用含有0.5%（w/v）叠氮钠的PBS重新平衡柱子，将从柱子中回收的mAb 13-Sepharose储存于4℃。
11. 从每个分段收集的液体中，各取出25 μl的样品至微量离心管中，分别加入25 μl 1×PBS和12.5 μl 5×SDS-PAGE样品缓冲液。在沸水浴中加热3 min，上样于6% SDS-聚丙烯酰胺凝胶（单元7.1）。
12. 用考马斯亮蓝染液对凝胶进行染色1 h（单元7.6）。脱色后，检查整合素的洗脱情况。
13. 将步骤9中含有纯化的β1整合素的液体收集在一起，于48 000g，4℃离心10 min。将上清液与2 ml mAb 16-Sepharose混合后，在旋转摇床上摇动2h。将该悬液装入直径0.8cm的Poly-Prep 2ml一次性聚丙烯柱子中，以12 ml洗涤缓冲液洗柱。
14. 以5 ml洗脱缓冲液洗脱α5β1整合素，按每管0.4 ml收集在已加入0.1 ml 1mol/L Tris·Cl（pH8.2）的1.5ml微量离心管中。在洗脱时将二者混合以保证迅速的中和。分段收集的液体在−70℃可以储存2年。
15. 用5 ml 0.1mol/L Tris·Cl（pH8.3）/0.1%（w/v）TritonX-100中和柱子。用含有0.5%（w/v）叠氮钠的PBS重新平衡柱子，将mAb 16-Sepharose储存于4℃。
16. 用SDS-PAGE分析分段收集的液体（与步骤11和12相似）。如在整合素纯化过程中出现问题，请参考表13.4.2中的解决方案。

α5整合素的分子质量约为150kDa，β1整合素的分子质量约为130kDa。

表13.4.3 在整合素纯化过程中可能出现问题的解决方案

问 题	可能原因	解决办法
有大量蛋白质和整合素一起被纯化出来	对抽提液的过滤不够充分，或在纯化过程中有沉淀形成	在用Sepharose 4B过滤抽提液后再次离心，或在有沉淀形成时进行离心
纯化得到的整合素的量很少	与Sepharose结合的单抗（mAb）不足	使更多的单抗与Sepharose结合
	单抗的亲和力很低	使用具有高亲和性的单抗
	柱子使用次数太多	更换新的mAb-Sepharose
整合素降解	抽提缓冲液中的蛋白酶抑制剂浓度不够	提高抽提缓冲液中的蛋白酶抑制剂和BSA的浓度
	进行抽提或其他操作时的温度太高	所有的操作都在4℃或冰上进行

支持方案2 抗体与Sepharose的交联

材料（带√项见附录1）

拟交联的抗体和IgG：β1整合素和α5整合素的单克隆抗体（如mAb 13和mAb 16；来自K. M. Yamada，National Institute of Health）和兔IgG（Sigma）

交联缓冲液：0.5mol/L NaCl/0.1mol/L $NaHCO_3$（室温保存 6 个月）

溴化氰活化的 Sepharose（Sigma）

1mmol/L HCl

1mol/L 乙醇胺，溶于水（室温保存 6 个月）

乙酸盐洗涤缓冲液：0.1mol/L 乙酸钠（pH 4.0，以冰乙酸调整 pH）/0.5mol/L NaCl（室温保存 6 个月）

Tris 洗涤缓冲液：0.1mol/L Tris·Cl（pH 8.0，见溶液配方）/0.5mol/L NaCl（室温保存 6 个月）

磷酸缓冲盐溶液（PBS；用 Life Technologies 的 10×储备液配制），含有 0.5%（w/v）叠氮钠（来自 20% w/v 溶于水的叠氮钠储备液）

√ PBS（Life Technologies）

布氏漏斗（Buchner funnel），装有中等孔径的多孔玻璃滤片

带侧臂的锥形瓶

50ml 带旋盖的聚丙烯离心管

旋转摇床（Cole-Parmer）

1. 在不含胺的缓冲液（如 PBS 或交联缓冲液；见附录 3C）中透析抗体（如果必要的话）。于 280 nm 检测透析后的单克隆抗体的吸光度值。然后，稀释/浓缩抗体至1mg/ml。
2. 在 50 ml 的 1 mmol/L HCl 中预溶胀溴化氰活化的 Sepharose。在布氏漏斗中，以 200∶1 的体积比例用 1 mmol/L HCl 洗涤树脂。制备 50%树脂/PBS 混悬液。
3. 按如下方法将抗体（1 mg/ml）与溴化氰活化的 Sepharose 进行混合。
   a. 对 mAb 13：每毫升 Sepharose 混悬液加入约 2 mg 单抗
   b. 对 mAb 16：每毫升 Sepharose 混悬液加入约 5 mg 单抗
   c. 对兔 IgG：每毫升 Sepharose 混悬液加入 2 mg IgG。

   交联反应在室温进行 2h。
4. 将布氏漏斗置于带侧臂的锥形瓶上，在交联反应结束后，把反应液加至布氏漏斗内，通过真空过滤除去上清液。于 280 nm 检测回收的上清液的吸光度值，并依据以下公式与起初测得的值相比较（D 是稀释因子，即滤过后体积除以初始溶液的体积）。

$$交联效率=\left(1-\frac{滤过液的 A_{280}\times D}{初始溶液的 A_{280}}\right)\times 100\%$$

5. 在布氏漏斗内，以 20 ml 交联缓冲液洗涤 Sepharose，通过真空抽吸去除残留液体。用刮勺从漏斗内回收 Sepharose，转移至含有 20 ml 1mol/L 乙醇胺的 50ml 锥形底的聚丙烯离心管中，在旋转摇床上室温孵育 1 h。
6. 再把 Sepharose 转移至布氏漏斗上，用 50 ml 的乙酸盐洗涤缓冲液和 50 ml 的 Tris 洗涤缓冲液交替洗涤 3 次。
7. 以 20 ml PBS 洗涤 Sepharose，然后将 Sepharose 置于 PBS/0.05%叠氮钠中，4℃储存。

支持方案 3　用生物素标记整合素配体

材料

感兴趣的配体
交联缓冲液：0.5mol/L NaCl/0.1mol/L $NaHCO_3$（室温保存 6 个月）
Sulfo-NHS 生物素（Pierce）
Tris/盐溶液：25 mmol/L Tris · Cl（pH 7.4）/150 mmol/L NaCl
含有 0.05%叠氮钠的 Tris/盐溶液
旋转摇床（Cole-Parmer）

1. 在 1L 的交联缓冲液（附录 3C）中，室温透析配体至少 2 h。
2. 在透析后的配体溶液加入相同质量的 Sulfo-NHS 生物素（约 0.25 mg），转移至 1.5ml 微量离心管中，在旋转摇床上，室温混合 30 min。
3. 用 1L Tris/盐溶液室温透析上述液体 2 次，然后用 1L 含有 0.05%叠氮钠的 Tris/盐溶液室温透析 1 次，每次透析的时间不低于 2 h。
4. 将透析后的液体转移至 1.5ml 微量离心管中，在室温以最大转速离心 15min。
5. 检测上清液中的生物素标记的蛋白质含量，例如，利用 BCA 试验（附录 3B）进行检测。标记后的蛋白质在 4℃可以储存 6 个月。

参考文献：Akiyama et al.，1989；Mould et al.，1996；Yamada and Yamada，1990
撰稿人：A. Paul Mould

单元 13.5　分析由免疫球蛋白超家族细胞黏附分子所介导的细胞-细胞联系

钙离子非依赖性的细胞黏附分子（CAM）组成了很大的细胞表面分子家族。免疫球蛋白超家族（IgSF）分子则属于其中的主要组分。免疫球蛋白超家族是一个含有 100 多种蛋白质的蛋白质超家族，参与了细胞-细胞的黏附过程。

基本方案 1　通过免疫亲和层析技术纯化 IgSF-CAM

材料（带√项见附录 1）

溴化氰活化的 Sepharose 4B 层析柱（见支持方案 1）
上样缓冲液：0.5% CHAPS，溶于含 Ca^{2+}/Mg^{2+} 的 PBS 中
洗脱缓冲液：0.5% CHAPS，溶于二乙胺中
蛋白质溶液（见支持方案 2）
√ 1 mol/L Tris · Cl，pH 7.0
√ 含 Ca^{2+}/Mg^{2+} 的 PBS
0.02%（v/v）硫柳汞或等效的抑菌剂

1. 用上样缓冲液充分洗涤层析柱（尤其是以前制备的并储存了一段时间的层析柱）。向柱子内加入 2～3 倍体积的洗脱缓冲液，在洗脱条件下测试层析柱的稳定性，以确保层析柱中不含有任何污染物（如在以前的使用过程中残留的非特异性结合的蛋白质）。在加入蛋白质溶液之前，于 4℃重新平衡层析柱使之达到上样的条件。
2. 在向层析柱加入蛋白质溶液时，调整至很慢的流速（通常为 0.1 ml/min），以使抗原与交联抗体的 Sepharose 微珠发生良好的相互作用。
3. 以 0.9 倍体积的洗脱缓冲液孵育层析柱 10 min。
4. 按流速 1 ml/min 洗脱柱子。在含有足够的 1 mol/L Tris·Cl（pH 7.0）的小瓶中收集洗脱液，使洗脱液保持中性 pH。
5. 再次平衡层析柱使之达到上样的条件，或者经过处理使之便于储存。
6. 在洗脱结束后，立即用含 Ca^{2+}/Mg^{2+} 的 PBS 将层析柱重新平衡至中性 pH。如果要储存起来，则向 PBS 中加入 0.02%（v/v）硫柳汞或等效的抑菌剂以抑制细菌生长。将处理后的层析柱储存于 4℃。

支持方案 1　制备亲和层析柱

材料

溴化氰活化的 Sepharose 4B 凝胶
1 mmol/L HCl
缓冲液 I：0.5 mol/L NaCl/0.1 mol/L $NaHCO_3$（pH 8.3）
针对拟纯化蛋白质的单克隆抗体
0.2mol/L 甘氨酸（pH 8.0）
缓冲液 II：0.5 mol/L NaCl/0.1 mol/L 乙酸钠（pH 4.0）
上样缓冲液（见基本方案 1）
与真空泵连接的多孔玻璃滤器
柱子（如 Poly-Prep 柱，Bio-Rad）
可以密闭的 U 型底聚丙烯小管

1. 按照 1∶2（w/v）的比例，将溴化氰活化的 Sepharose 4B 浸入 1 mmol/L HCl 中，室温保持 15 min。
2. 把 Sepharose 微珠转移至与真空泵连接的多孔玻璃滤器中，以 25 倍体积或更多的 1mmol/L HCl 进行漂洗，接着用 25 倍体积或更多的缓冲液 I 漂洗。
3. 先后将溶于缓冲液 I 的抗体溶液、Sepharose 混悬液转移至 U 型底聚丙烯小管中，室温反应 2 h。将小瓶密闭。

   终浓度：每 1 ml 的交联反应体系中，含有 100 mg Sepharose（干重）以及 5 mg 的抗体。
4. 把 Sepharose 微珠在室温，2000g 离心 5 min，终止反应。
5. 向沉淀物中加入 3 倍体积的 0.2 mol/L 甘氨酸（pH 8.0），接着旋转摇动小管（上下

依次颠倒的方式）2 h。收集交联反应的上清液，检测交联效率。

6. 将混悬液装入柱子中。依次用 5 倍体积的缓冲液 I 和 5 倍体积的缓冲液 II 洗柱。重复洗柱 4 次，以去除多余的未结合的配体。
7. 在加蛋白质溶液（见支持方案 2）之前，用 25～30 倍体积的上样缓冲液洗柱。

支持方案 2　溶解膜蛋白

许多的 IgSF-CAM 是糖基-磷脂酰肌醇锚定的蛋白质或是跨膜蛋白，因此，必须使用去垢剂才能将它们从细胞膜上溶解出来。

注意：所有使用活的动物的实验方案必须得到单位内实验动物管理委员会的批准，或遵守政府关于使用实验动物的管理规定。

材料（带√项见附录 1）

14 天的鸡胚脑组织，新鲜冷冻于液氮中
液氮
√ 不含 Ca^{2+}/Mg^{2+} 的缓冲液（CMF 缓冲液）
0.8mol/L 以及 2.25mol/L 蔗糖，溶于 PBS（见溶液配方）
1mol/L 以及 2mol/L NaCl，溶于 PBS
50 mmol/L 三乙胺
0.5% 以及 1% CHAPS，溶于 PBS
研钵及研棒
Dounce 匀浆器
适合 Sorval SS-34 离心机或同类离心机的离心管
适合超高速离心的 38ml 的聚碳酸酯离心管

1. 取出 14 天鸡胚的脑组织，迅速冷冻至液氮中。
2. 将适当大小的研钵及研棒置于液氮中预冷，然后分批对冷冻的脑组织块进行研磨，使之成为粉末状。在研磨的过程中向研钵中加入少量的液氮，保持组织的冷冻状态。
3. 向脑组织粉末中加入 3 倍体积的 CMF 缓冲液。用 Dounce 匀浆器进行研磨，使之均质化。然后将匀浆液于 4℃，45 000*g* 离心 20 min。
4. 将沉淀物重新悬浮于 1.5～2 倍体积的 2.25mol/L 蔗糖溶液中，再次利用 Dounce 匀浆器进行研磨，得到匀浆悬液。在每个聚碳酸酯超速离心管中加入 24 ml 匀浆悬液，上面再覆盖以 1/4 体积的 0.8mol/L 蔗糖溶液。于 4℃，150 000*g* 离心 60min。
5. 把集中在中间的膜物质转移至 Dounce 匀浆器中，以 25 倍体积的 PBS 重新悬浮后，继续研磨。于 4℃，150 000*g* 离心 60min。
6. 轻柔地倒去上清液，将沉淀物重新悬浮于 PBS，于 4℃，150 000*g* 离心 60min。将沉淀物重新悬浮于尽可能少的 PBS 中，在－20℃可以储存 1 个月，或者继续下述的操作。
7. 向步骤 6 中的浓稠悬浮液中加入 1 倍体积的 2 mol/L NaCl（溶于 PBS），用匀浆器研

磨该悬液。

8. 再加入 1 mol/L NaCl（溶于 PBS），使溶液的体积达到步骤 6 中的浓稠悬浮液体积的 4～5 倍。在磁力搅拌器上，用磁力搅拌子于 4℃低速搅动悬液 1 h，使细胞膜与膜周蛋白脱离。于 4℃，150 000*g* 离心 60min。
9. 将沉淀物重新悬浮于 20 倍体积的 50 mmol/L 三乙胺中，于 4℃搅拌 1 h。于 4℃，150 000*g* 离心 60min。小心用移液器去除上清液（这是由于细胞膜物质在高 pH 抽提后并不能形成结实的沉淀物）。
10. 将沉淀物重新悬浮于 PBS 中。于 4℃，150 000*g* 离心 60min。
11. 重复用 PBS 漂洗细胞膜物质至少 1 次。使液体的 pH 恢复至 7.2～7.6。分装出一小份以备测定蛋白质浓度。
12. 将细胞膜物质冻存于－20℃（可保存 1 个月）或者去作下述的溶解步骤。
13. 如果使用的是冻存的细胞膜物质，则用 PBS 漂洗 1 次（具体过程同步骤 10）。
14. 将沉淀物（约含 1 mg/ml 蛋白质）转移至 Dounce 匀浆器中，重新悬浮于 1 倍体积的 1% CHAPS 溶液中。再加入 4 倍体积的 0.5% CHAPS 溶液。将该悬浮液在 4℃搅拌 1 h，抽提膜蛋白。于 4℃，150 000*g* 离心 60 min。
15. 收集上清液并测量其体积，分装出一小份去测定蛋白质浓度（附录 3A 或 3B）。直接使用或作亲和层析。

基本方案 2　利用荧光微球分析蛋白质的相互作用

材料（带√项见附录 1）

结合荧光微球的蛋白质；每毫升储备液中含有 10^{11} 个微球，溶于 0.5%（w/v）的 BSA（见支持方案 3；Duke Scientific；Bangs Laboratories；Polysciences）

√ 0.5%（w/v）的 BSA

0.5 mg/ml 针对感兴趣蛋白质的抗体的 Fab 片段，溶于 PBS（可选）

0.5%（w/v）的胰蛋白酶（可选）

√ PBS

水浴超声波仪（Branson Ultrasonic）

带有 FITC 和 TRITC 滤光片的荧光显微镜

0.5ml 的微量离心管

旋转摇床

载玻片

冷冻式微量离心机

荧光激发的流式细胞仪

1. 在水浴超声波仪中，对含有结合荧光微球的蛋白质储备液的试管，在室温进行超声 2 min。在超声时，要使用最低的超声输出功率，这样可以获得单分散的微球溶液以避免蛋白质结构的破坏。立即取少量超声后的储备液，用 0.5% BSA 1∶100 稀释后，在荧光显微镜下检查荧光微球的单分散性。

2. 在超声结束后，立即准备待测溶液，即将结合不同荧光色微球的蛋白质混合在一起。在0.5ml的微量离心管中，加入2 μl绿色荧光微球标记的蛋白质1，再加入2 μl红色荧光微球标记的蛋白质2，用0.5% BSA溶液调整总体积至20 μl（在待测溶液中，每种微球的浓度是10^{10}个/ml）。涡旋振荡混合微球。同时，使用尽可能多的对照。典型的对照溶液如下：
   a. 每种类型的微球单独存在的溶液。
   b. 与对照蛋白（即不会与感兴趣蛋白结合的蛋白质，如BSA、未免疫IgG）结合的微球。
   c. 在沸水浴中孵育10 min（或0.5%的胰蛋白酶过夜处理）的与蛋白质结合的微球。
   d. 以针对感兴趣蛋白的抗体的Fab片段预处理的微球。按照下列步骤进行处理：将适量的微球储备液与0.5 mg/ml多克隆IgG来源的Fab在室温共同孵育2h。用PBS连续洗3次，去除未结合的抗体。在更换漂洗液时，将微球置于微量离心管中于4℃，16 000*g*离心10 min。用超声波处理使聚集物溶解（方法同步骤1）。
3. 在旋转摇床上，室温，避光，缓慢摇动待测溶液1 h。
4. 用荧光显微镜分析待测溶液的聚集物形成情况。即将各种不同条件的待测溶液用0.5% BSA溶液1∶10稀释后，取20 μl滴至载玻片上进行观察。
5. 用流式细胞仪对聚集物的形成情况做定量分析。用每种颜色的未聚集的微球来校正流式细胞仪。
6. 把待测溶液用0.5% BSA溶液1∶1000稀释后，注入荧光激发的流式细胞仪（带有相应的FITC和TRITC滤光片）。
7. 用未包被的、未聚集的微球来决定每种颜色的微球的相对荧光强度（relative fluorescence intensity，RFI）。校正FITC和TRITC发射光的光谱重叠。
8. 记录输出结果，如混合性聚集物的数量、大小和组成等。

支持方案3　将蛋白质与荧光微球相交联

附加材料（其余见基本方案2）

每毫升含10^{11}个未结合的微珠的荧光聚苯乙烯微球（0.5μm直径）（Duke Scientific; Bangs Laboratories; Polysciences）

生物化学方法纯化的IgSF-CAM（见基本方案1），溶于磷酸缓冲液系统（PBS或者20 mmol/L磷酸钠，pH 7.0）

1. 将每毫升含有10^{11}个未结合的微珠的荧光聚苯乙烯微球的试管置于水浴中，室温超声处理2min。如果微珠溶液成为单分散的，则取100 μl至新管，加入50 μg溶于PBS的生物化学方法纯化的IgSF-CAM，使总体积达到1 ml（交联时的浓度为每毫升含10^{10}个微珠）。涡旋振荡混合。在37℃水浴中孵育1h，间歇地将试管上下颠倒混匀。
2. 于4℃，16 000*g*离心10min。吸出含有未结合蛋白质的上清液，以备交联分析。将微珠重新悬浮于1 ml 0.5% BSA溶液中。
3. 超声处理微珠（方法同步骤1），室温孵育30 min。

4. 于 4℃，16 000g 离心 10 min，将沉淀物重新悬浮于 100 μl 0.5% BSA 溶液中。4℃储存。
5. 备选步骤：将交联前后的蛋白质样品进行一系列稀释后，进行 SDS-PAGE，确定交联的产量。

基本方案 3　蛋白微球与培养细胞的结合

材料（带√项见附录 1）

原代培养的神经细胞和/或神经胶质细胞，或其他细胞
细胞培养用完全培养基
无血清，含 BSA 的细胞培养基
每毫升含 10^{11} 个微珠的结合蛋白的荧光聚苯乙烯微球；溶于 0.5% BSA 的储备液（见支持方案 3）
0.5 mg/ml 针对感兴趣蛋白的 Fab，溶于无血清培养基中（供选用）
√ 固定液
√ PBS
√ 封片液
水浴超声波仪
37℃，10% CO_2 的湿润孵箱
玻璃载玻片
荧光显微镜

1. 培养原代的神经细胞和/或神经胶质细胞较少量的培养液中。
2. 以完全培养基漂洗培养的细胞 1 次，然后用无血清、含 BSA 的细胞培养基洗细胞 1 次。
3. 用无血清细胞培养基 1∶1000 稀释每毫升含 10^{11} 个微珠的结合蛋白的荧光聚苯乙烯微球，用超声波仪在室温处理 2 min，立即加入到培养细胞中。
4. 备选步骤：为了测试某种特定的 CAM 是否能与特定类型的细胞通过某种受体（有针对该受体的抗体）结合，在加入微珠之前，先将细胞与 0.5 mg/ml 的 Fab 在无血清培养基中进行预先孵育，即在 37℃，10% CO_2 的湿润培养箱中孵育 2h。在进行步骤 5 之前，用无血清培养基洗 2 次，以去除未结合的抗体。为了测试微珠与细胞结合的特异性，需同时准备作对照的结合蛋白的微珠，以及与相应的 Fab 片段预先孵育的微珠。
5. 将细胞与步骤 3 中的微珠溶液在 37℃，10% CO_2 的湿润细胞培养箱中孵育 1h。
6. 用巴斯德吸管小心吸去含有未结合微珠的培养基，立即加入无血清培养基。重复 3 次。
7. 吸去剩余液体，加入 240 μl 无血清培养基，再加入 80 μl 4×固定液，固定细胞。轻柔混匀后，37℃孵育 1h。
8. 用 PBS 漂洗固定的细胞，共洗 3 次。

9. 如果想对细胞作荧光染色，请参见单元 5.3 中的操作。如果不做的话，将细胞在玻璃载玻片上进行封片，然后在荧光显微镜下进行观察。

基本方案 4　用骨髓瘤细胞作交互作用试验

材料（带√项见附录 1）

两种骨髓瘤细胞克隆，分别表达感兴趣的 CAM

选择性培养基，如添加 10%（v/v）FCS 的含有 5 mmol/L L-组氨醇的 DMEM

√ 含 Ca^{2+}/Mg^{2+} 的 PBS

能产生绿色荧光的储备液，如溶于 DMSO 的 1 mmol/L 的 2′，7′-双-2-羧乙基-5(-6)-羧基荧光素乙酰甲基酯（BCECF-AM，Moleular Probe）

能产生红色荧光的储备液，如溶于 DMSO 的7.5 mmol/L 的5(-6)-羧基萘酚荧光素双乙酸盐（CNFDA，Moleular Probe）

1%（v/v）FCS，溶于含 Ca^{2+}/Mg^{2+} 的 PBS 中（见 PBS 配方）

5mg/ml 对苯二胺，溶于1%(v/v)FCS，含 Ca^{2+}/Mg^{2+} 的 PBS 中（见 PBS 配方）

15ml 锥形聚丙烯离心管

血球计数板

V 型 96 孔微量滴定板（如 Costar，Corning）

1ml 注射器，带 22G 针头

玻璃载玻片

带有相应的红绿荧光滤光片的荧光显微镜（如 FITC 和 Texas Red）

1. 在选择性培养基中培养转染的骨髓瘤细胞克隆（在细胞表面表达感兴趣的 CAM），使细胞密度达到约 5×10^5个/ml。用血球计数板监测细胞密度。
2. 在 15ml 锥形聚丙烯离心管中，加入 5～10 ml 培养细胞，室温，500g 离心 3min。弃去上清液，将细胞重新悬浮于 1～2 ml 含 Ca^{2+}/Mg^{2+} 的 PBS 中。用血球计数板检测细胞密度，使细胞密度达到 5×10^5个/150μl（每个样品）。在 V 型 96 孔微量滴定板中的每个孔中加入 150μl 细胞悬液，于室温，500g 离心 96 孔板 3min，将小孔内的上清液甩到废液缸（细胞会留在小孔内）。用 90μl 含 Ca^{2+}/Mg^{2+} 的 PBS 重新悬浮细胞。
3. 新鲜制备红色和绿色荧光染料的工作液，即取 10μl 储备液，加入 990μl 含 Ca^{2+}/Mg^{2+} 的 PBS 稀释。取 10μl 相应的工作液，加入含 90μl 细胞悬液的小孔中。一种荧光染料用一排小孔。于 37℃孵育 30 min。
4. 离心 96 孔板，弃去上清液（同步骤 2）。将细胞重新悬浮于 150μl 含 Ca^{2+}/Mg^{2+} 的 PBS 中。重复 1 次。
5. 室温，500g 离心 96 孔板 2 min，将小孔内的上清液甩到废液缸。用 75μl 1%（v/v）FCS（溶于含 Ca^{2+}/Mg^{2+} 的 PBS 中）重新悬浮细胞。
6. 将互补染色的两种细胞样品混合于一个小孔中。用带 22G 针头的 1ml 注射器缓慢上下吹打细胞样品 10 次，使细胞解离（避免出现泡沫）。于 4℃孵育 45 min。

7. 室温，500g 离心 96 孔板 2 min，将小孔内的上清液甩到废液缸。用 150μl 1% FCS（溶于含 Ca^{2+}/Mg^{2+} 的 PBS 中）重新悬浮细胞。重复 1 次。
8. 离心 96 孔板，弃去上清液（同步骤 7）。用 40μl 1% FCS（溶于含 Ca^{2+}/Mg^{2+} 的 PBS 中）重新悬浮细胞。
9. 在对单个样品进行显微镜分析之前，在样品中加入 10 μl 5 mg/ml 对苯二胺（溶于 1% FCS，含 Ca^{2+}/Mg^{2+} 的 PBS 中）。用 200μl 移液器吸头上下反复吹打样品数次。取 10 μl 样品封片至载玻片上。
10. 利用带有 FITC 和 Texas Red 滤光片的荧光显微镜分析细胞聚集物形成情况。

支持方案 4　用原生质体融合方法对骨髓瘤细胞进行稳定转染

注意：所有与活细胞接触的液体和设备都必须是无菌的，在处理细胞时要应用无菌操作技术。所有细胞都应该在湿润的培养箱中，以 37℃，5% CO_2 进行培养。某些培养基（如 DMEM）需要调节 CO_2 浓度以维持培养液的 pH。

注意：下列的试验方案是针对一个样品。建议作平行试验的样品数不要超过 4 个。

材料（带√项见附录 1）

转化入含有感兴趣的 IgSF-CAM 的真核表达载体的大肠杆菌菌株 803 克隆（ATCC ＃35581）的甘油储备液
√ LB 琼脂/氨苄青霉素平板（储存于 4℃）
添加 10%（v/v）FCS 的 DMEM
√ LB 培养基，预热至 37℃
50 mg/ml 氨苄青霉素（储存于－20℃）
60 mg/ml 溶于乙醇的氯霉素（储存于－20℃）
添加 10%（w/v）蔗糖和 10 mmol/L $MgCl_2$ 的 DMEM，预热
20%（w/v）蔗糖，溶于 50 mmol/L Tris・Cl，pH 8.0，冰上预冷
新鲜制备的 1 mg/ml 溶菌酶（Roche Molecular Systems），即取 10 mg 溶菌酶溶解于 250 mmol/L Tris・Cl（pH 8.0），然后用 0.22μm 滤膜过滤
√ 250 mmol/L EDTA（pH 8.0），冰上预冷
√ 50 mmol/L Tris・Cl（pH 8.0），冰上预冷
10 mg/ml DNase I（Roche Molecular Systems；储存于－20℃）
√ DMEM
√ PEG1500，溶于添加 DMSO 的 DMEM
小鼠 BALB/c 骨髓瘤细胞系 J558L（ECACC ＃88032902）或另外一种骨髓瘤细胞系
50 mg/ml 卡那霉素
√ 50 mmol/L L-组氨醇
多克隆抗 IgSF-CAM 抗体
结合荧光的二抗

25ml 细胞培养瓶
12ml 和 50ml 聚丙烯试管
15ml 和 50ml 的锥形聚丙烯离心管
37℃细菌摇床
500ml 锥形瓶
台式冷冻离心机
37℃水浴
玻璃载玻片
可以放大 1000 倍的显微镜
多道移液器托盘
24 孔和 96 孔组织培养板
多道移液器和移液器吸头
塑料薄膜（如萨兰保鲜膜）
V 型孔的 96 孔板

1. 挑取少量转化入真核表达载体的大肠杆菌菌株 803 克隆的甘油储备液，划线涂布于 LB 琼脂/氨苄青霉素平板上。37℃过夜培养。
2. 用 25ml 细胞培养瓶，将骨髓瘤细胞培养于添加 10%（v/v）FCS 的 DMEM 中。使细胞在第 3 天达到较高的密度，浓度约 1×10^6个/ml（原生质体融合时，每个样品需要 5×10^6个细胞）。
3. 从划线涂布的 LB 琼脂/氨苄青霉素平板上挑取单个的大肠杆菌克隆，接种于 2 ml 预热至 37℃的 LB 培养基中，移至 12ml 聚丙烯试管，在 37℃的细菌摇床上以250r/min 培养 4h。
4. 在 500ml 锥形瓶中，加入 100 ml LB 培养基以及 100μl 50mg/ml 氨苄青霉素，然后再加入 100 μl 细菌培养物。培养细菌，在 3h 后开始监测 OD_{600}，使之达到约 0.6。
5. 在 OD_{600}达到 0.6 后，加入 200μl 60mg/ml 氯霉素至终浓度 120μg/ml，在 37℃的细菌摇床上以 250r/min 过夜培养。
6. 将过夜培养物转移至 2 个 50ml 的锥形聚丙烯离心管中，于 4℃，2500*g* 离心 10 min。
7. 与此同时，用 50ml 聚丙烯试管，在 37℃水浴中预热 20ml 添加 10%蔗糖和 10 mmol/L $MgCl_2$的 DMEM。
8. 弃去离心后细菌培养物的上清液。从这以后，要在无菌的超净工作台中进行操作。将两管细菌沉淀物一并溶于 2.5 ml 冰冷的 20%蔗糖（溶于 50 mmol/L Tris · Cl，pH 8.0）中，涡旋振荡混合。
9. 加入 500 μl 冰冷的 1 mg/ml 溶菌酶（溶于 250 mmol/L Tris · Cl，pH 8.0)，轻柔摇匀（使之形成涡流），在冰上孵育 5 min。加入 1 ml 冰冷的 250 mmol/L EDTA（pH 8.0)，轻柔摇匀，置于冰上 5 min。
10. 加入 1 ml 冰冷的 50 mmol/L Tris · Cl（pH 8.0)，轻柔摇匀（使之形成涡流），室温孵育 10 min。在此孵育期间，取 10 μl 样品封片至玻璃载玻片上，在显微镜下用 1000×放大倍数观察原生质体形成情况。

11. 非常缓慢地向脆弱的原生质体溶液中加入 20 ml 添加 10%蔗糖和 10 mmol/L $MgCl_2$ 的 DMEM，即轻柔地摇晃原生质体溶液使其形成涡流，然后逐滴加入添加 10%蔗糖和 10 mmol/L $MgCl_2$ 的 DMEM，使加入的液体慢慢增多。接着，加入 40 μl 10 mg/ml DNase I，室温孵育 15 min。
12. 与此同时，分别用 50ml 聚丙烯试管，在 37℃水浴中预热下列液体：

    15 ml DMEM

    10 ml 添加 10%（v/v）FCS 的 DMEM

    50 ml 添加 10%（v/v）FCS 的 DMEM

    在室温融解下列液体：

    2 ml PEG 1500，溶于添加 DMSO 的 DMEM 中。
13. 用 50ml 聚丙烯离心管，将原生质体溶液于室温，2500*g* 离心 30min。
14. 与此同时，将 5×10^6 个细胞的小鼠 BALB/c 骨髓瘤细胞系转移至 15ml 锥形聚丙烯离心管中，于室温，500*g* 离心 10min。弃去上清液，将细胞重新悬浮于 5 ml 预热的无血清 DMEM 中。
15. 弃去将原生质体溶液离心后的上清液。在 50ml 锥形聚丙烯离心管中，缓慢地将骨髓瘤细胞覆盖于原生质体沉淀物的上面。于室温，500*g* 离心 10min。
16. 弃去上清液。用手轻弹试管并在台面上轻磕试管，使细胞和原生质体混合。加入 2 ml PEG 1500（溶于添加 DMSO 的 DMEM 中）。用移液器上下吹打数次，重新悬浮沉淀物。
17. 在加入 PEG 溶液约 1～2 min 后，非常缓慢地加入 10 ml 预热的 DMEM，即轻柔地摇晃原生质体溶液使其形成涡流，然后逐滴加入 DMEM，使加入的液体慢慢增多。
18. 加入 10 ml 预热的添加 10% FCS 的 DMEM，轻柔摇匀（使之形成涡流），然后于室温，500*g* 离心 10 min。弃去上清液，使沉淀物重新悬浮于 50 ml 预热的添加 10% FCS 的 DMEM 中，再加入 100 μl 50 mg/ml 卡那霉素。
19. 将液体倒入多道移液器托盘中，用多道移液器分装至 96 孔组织培养板内，每孔 100 μl。将组织培养板用塑料薄膜包好，在 37℃，10% CO_2 的湿润培养箱中孵育 48h。
20. 48h 后，准备选择性培养基，即将 10 ml 预热的 50 mmol/L L-组氨醇加入 40 ml 预热的添加 10% FCS 的 DMEM 中。再加入 100 μl 50 mg/ml 卡那霉素。将混合液倒入多道移液器托盘中，用多道移液器加至 96 孔培养板内，每孔 100 μl。再次将 96 孔培养板用塑料薄膜包好，在 37℃，10% CO_2 的湿润培养箱中孵育。
21. 在加入选择性培养基约 10 天后，观察培养板是否出现克隆。

    在此期间，不需要更换液体，也无需其他处理。
22. 一旦出现肉眼可见的克隆，用间接免疫荧光染色方法（单元 5.3）检测其是否表达 IgSF-CAM。将 1 个细胞克隆中的≤50%的细胞转移至 V 型 96 孔板的小孔中，利用抗 IgSF-CAM 的多克隆抗体以及荧光标记的二抗，进行间接免疫荧光分析。由此确定哪些细胞克隆表达 IgSF-CAM。
23. 将呈阳性表达的细胞克隆转移至 24 孔板扩大培养。
24. 通过有限稀释法将阳性克隆在 96 孔板中培养，形成亚克隆。
25. 在选择性培养基（如 5 mmol/L L-组氨醇，溶于添加 10% FCS 的 DMEM 中）中培

养亚克隆。遵循标准程序将后备细胞冻存于液氮中（单元 1.1）。

基本方案 5　神经突外长试验

材料（带√项见附录 1）

鸡胚（E8～E10）
0.5％（v/v）葡萄糖，溶于 PBS
0.25％（w/v）胰蛋白酶，溶于无 Ca^{2+}/Mg^{2+} 的 PBS（Life Technologies）
√ 无血清培养基
用适当的底物包被了的组织培养皿（见支持方案 5 和 6）
无菌的解剖器械
15ml 离心管
火焰抛光的巴斯德吸管，管孔直径 0.3mm
牛鲍尔（Neubauer）氏血细胞计数室，用于细胞计数
35mm 细胞培养皿
图像分析软件及相关设备

1. 用适当的底物对 35mm 细胞培养皿进行包被。
2. 利用无菌的解剖器械，从 10 天的鸡胚中切取背根神经节（DRG）（Sonderegger et al. 1985）。取 1 个未包被的 35mm 细胞培养皿置于冰上，加入 1 ml 0.5％（v/v）葡萄糖（溶于 PBS），将背根神经节收集至该培养皿中。
3. 将 DRG 转移到一个 15ml 的离心管中，于室温 300～500*g* 离心 3～5min。仔细移去上清，向沉淀中加入 2ml 0.25％的胰蛋白酶（trypsin）溶液，将神经中枢重悬，37℃水浴孵育 25min；
4. 室温 300～500*g* 将 DRG 离心 3～5min，弃去含有胰蛋白酶溶液的上清，加入 1ml 无血清培养液；
5. 在火上将巴斯德吸管拉出直径约 0.3mm 的出口，用它来机械性地解离神经节至没有肉眼可见的细胞团。取一部分细胞悬液用血球计数板计数（单元 1.1）。
6. 在每个包被过的 35mm 细胞培养皿中加入 1ml 浓度为 150 000 个/ml 的细胞悬液，于 37℃、5％CO_2 饱和湿度的培养箱中孵育 24～30h；
7. 在适当的时间，测量从单个细胞体发出的没有与其他神经突起接触的神经突起的长度。计数每个神经元的神经突起数、分枝的数量以及分枝的顺序。测量伪足（filopodia）的面积、数量和长度。定量地表述结果。

（赵伟东 译　陈誉华 校）

基本方案 6　在体外抑制 CAM-CAM 相互作用

一个研究特定蛋白功能的方法是分析阻遏其功能后的改变。

材料（带√项见附录 1）

10 天的鸡胚胎（E10）

0.5%蔗糖的磷酸盐缓冲液（PBS）

√限定成分的无血清细胞培养液

对照 Fab

抗待研究的 CAM 的 Fab

15ml 离心管

用IgSF-CAM 包被的 8 孔细胞培养载玻片（如 Lab Tek，Life Technologies）（见支持方案 5）

巴斯德吸管或装有 200μl 吸头的自动移液器

1. 从 E10 的鸡胚剥离 DRG，放在 0.5%蔗糖的 PBS 中，置于冰上。
2. 将 DRG 转移到 15ml 离心管中，于室温或 4℃，300～500g 离心 3～5min，弃去上清，在实验台上轻弹管底并摇动试管使沉淀重溶于 1ml 无血清细胞培养液中。
3. 准备好用 IgSF-CAM 包被的 8 孔细胞培养载玻片。根据支持方案 5，每一个孔加入 300μl 的分别为不含 Fab、含对照 Fab、含不同浓度的抗待研究的 CAM 的 Fab 的培养液（如 100～500μg/ml 多克隆 IgG，10～500μg /ml 单克隆 IgG）。
4. 用巴斯德吸管或装有 200μl 吸头的自动移液器以尽可能小的体积接种 DRG，使 DRG 在 37℃、5%CO_2 饱和湿度的培养箱中生长 40h。
5. 将固定剂直接加入培养基中固定 DRG 以免贴壁的神经节漂离，分析抗体的效果。

支持方案 5　用 IgSF-CAM 包被细胞培养皿

材料（带√项见附录 1）

用来包被的蛋白质

√磷酸盐缓冲液（PBS）

用磷酸盐缓冲液（PBS）配制的 10mg/ml 牛血清白蛋白（BSA）溶液（如 Albumax，Life Technologies）

1. 用磷酸盐缓冲液（PBS）将蛋白质配成 10～100μg/ml 的溶液。按每 0.5cm^2 的培养皿加入 20μl 蛋白质溶液的标准将其均匀涂布于标记区域，或者使用足够量的蛋白质溶液覆盖整个培养皿。
2. 吸去蛋白质溶液，将整个培养皿用磷酸盐缓冲液（PBS）洗 3 遍。
3. 为了使塑料或玻璃的盖玻片的蛋白质吸附能力达到饱和，用 10mg/ml 的 BSA 溶液覆盖整个培养皿的表面，孵育 30min（每个 35mm 培养皿用 1ml）。
4. 将培养皿用磷酸盐缓冲液（PBS）洗 3 遍，在接种细胞之前再移走 PBS。为了结果的重复性好，切勿使包被过的蛋白质干燥，包被后需立即使用，勿储藏。

支持方案 6　硝酸纤维素预先包被玻璃表面

除非预先用硝酸纤维素包被，否则 IgSF-CAM 不能很好地黏附于玻璃表面。

材料

甲醇
0.2μm 孔径硝酸纤维素（如 BA-83，Schleicher and Schuell）
22mm 直径的盖玻片（包被前用丙酮清洁，干燥，高压灭菌）

1. 用 17ml 甲醇使 $5cm^2$ 的 0.2μm 孔径硝酸纤维素膜完全溶解。
2. 将 300μl 的硝酸纤维素膜的甲醇溶液用 3.7ml 无菌水稀释，配成包被液。
3. 22mm 直径的盖玻片用 200μl 包被液在层流通风橱中包被 2h。在使用前移走过量的包被液并使盖玻片干燥。在用 IgSF-CAM 包被之前制备，勿储藏。

参考文献：Sonderegger et al.，1985；Traunecker et al.，1991

撰稿人：Peter Sonderegger，Stefan Kunz，Christoph Rader，Daniel M. Suter，and Esther T. Stoeckli

单元 13.6　纤连蛋白的纯化

纤连蛋白是一种黏附性的糖蛋白，可以促进几乎所有的培养细胞的黏附、迁移和生长。纤连蛋白可从体液、培养细胞或组织中提取。

警告：操作人血液、细胞或感染性媒介物必须依照适当的生物安全规范。即使是筛查过的人血清也应按可能污染有 HIV 或肝炎病毒等感染性媒介物对待。任何时候都应穿戴两层手套、安全眼睛或护目镜以及适当的防护服。血浆离心应始终使用带盖的离心管或离心瓶。融化或加温过程中血浆应有双重包裹以防万一泄漏（如塑料袋包装的血浆应放到烧杯中后再去水浴）。任何沾染血浆的实验台面或皮肤应使用 10%的次氯酸钠漂白或含有碘的消毒剂如 Wescodyne 或 Providone。

基本方案 1　纯化血浆纤连蛋白

材料（带√项见附录 1）

1000ml（3～4U）剩余或过期的人血浆
琼脂糖凝胶 CL-4B（Amersham Pharmacia Biotech）
白明胶-琼脂糖凝胶（Amersham Pharmacia Biotech）
6mol/L 尿素
Tris 缓冲盐溶液（TBS）：0.9%（w/v）NaCl/10mmol/L Tris-・CL，pH7.5（见 Tris・Cl 配方）
√0.2mol/L EDTA，pH7.0

√0.2mol/L PMSF

ε-氨基-η-己酸

√柱缓冲液 A 和 B

√柠檬酸盐洗脱缓冲液

0.5mol/L 磷酸氢二钠

超纯硫酸铵（Life Technologies 或 Sigma）

√Dulbecco's PBS

√CAPS/盐（可选）

5cm 直径柱，≥5cm 高，用 Aquasil（Pierce）硅烷化

5cm 直径柱，≥10cm 高，用 Aquasil（Pierce）硅烷化

50ml 聚碳酸酯高速离心管

250ml 或 500ml 离心瓶

透析管（12 000～14 000MWCO；Spectrapor 或等同）

高速冷冻离心机带有 GS-3 或 GSA 转头（Sorvall）或等同的转头

1. 先行柱用 100ml 琼脂糖凝胶 CL-4B 装柱（5cm 直径，≥5cm 高），至少用 300ml 柱缓冲液 A 靠重力以尽可能快的速度洗。
2. 用 200ml 白明胶-琼脂糖凝胶装柱（5cm 直径，10cm 高），用不少于 800ml 的溶于 TBS 的 6mol/L 尿素洗白明胶-琼脂糖凝胶，再用不少于 800ml 的柱缓冲液 A 洗。
3. 将血浆加热到 37℃；
4. 边搅动边向血浆中加入蛋白酶抑制剂：
   25ml 0.2mol/L EDTA（终浓度 5mmol/L）
   5ml 0.2mol/L PMSF（终浓度 1mmol/L）
   6.6g ε-氨基-η-己酸（终浓度 50mmol/L）
5. 室温 10 000*g* 离心 15min，保留上清。
6. 以最快的速度将血浆加到先行柱上，然后立即将流出物加到白明胶-琼脂糖凝胶柱上，流速不超过 500ml/h。
7. 以尽可能快的速度用 800ml 柱缓冲液 B 洗，再用 400ml 柱缓冲液 A 洗。
8. 用柠檬酸盐洗脱液从柱上洗脱纤连蛋白，每组 40ml 收集，用分光光度计（A_{280}）测量各组分，确认是否存在洗脱下来的纤连蛋白。合并各组洗脱产物，每 40ml 洗脱液立即加入 4ml 0.5mol/L 磷酸氢二钠中和。
9. 如果需要比洗脱液浓度更高的纤连蛋白，则按每毫升洗脱液加入 0.291g 的量在冰上搅动的同时缓慢加入硫酸铵（50%饱和度）至全部溶解以沉淀纤连蛋白。硫酸铵处理的纤连蛋白在冰上静置至少 2h。
10. 在 4℃ 10 000*g* 离心 15min。重新溶解沉淀。在 3.5L 适当的缓冲液中于 4℃搅动透析数日，以除去任何残留的硫酸铵，每天更换透析液。
11. 测定纤连蛋白的浓度。
    最容易的方法是用 A_{280} 测定，消光系数为 1.28ml/(mg·cm)。
12. SDS-PAGE 分析。

在还原剂存在的条件下，血浆纤连蛋白在 230kDa 和 220kDa 处存在两条带

13. 分装并在干冰上冷冻，－80℃保存。

基本方案 2　从培养细胞中纯化纤连蛋白

材料（带√项见附录 1）

使用有血清培养液在滚动瓶上培养至长满的成纤维细胞

√Hank 平衡盐溶液（HBSS）

√DMEM 培养液

100mmol/L 谷氨酰胺

√0.2mol/L PMSF

超纯尿素（Life Technologies 或 ICN）

超纯硫酸铵（Life Technologies 或 Sigma）

√0.2mol/L CAPS 缓冲液，pH11.0

√CAPS/盐

滚动瓶培养装置

高速冷冻离心机

50ml 聚碳酸酯高速离心管

透析管（12 000～14 000MWCO；Spectrapor 或同类产品）

1.5cm 聚丙烯柱，高 5cm

12×75mm 聚丙烯管

1. 将 2000ml HBSS 和 1500ml DMEM（补加 60ml 100mmol/L 谷氨酰胺至终浓度 4mmol/L、15ml 0.2mol/L PMSF 至终浓度 2mmol/L）加热至 37℃。
2. 用预热的 HBSS 轻轻漂洗滚动管，每次 50ml 洗 4 次，弃去漂洗液。
3. 每瓶加入 25ml 含有 4mmol/L 谷氨酰胺和 2mmol/L PMSF 的 DMEM，37℃以 1r/min的速度转动孵育 1h，洗去单层细胞中吸收的血清蛋白。
4. 将 30g 超纯尿素溶于 DMEM 中，补加谷氨酰胺至终浓度为 4mmol/L 的，最终体积为 250ml，加温至 37℃，用前加入 2.5ml 0.2mol/L PMSF（终浓度 2mmol/L）。
5. 弃去无血清培养液，每瓶加入 20ml 新配制的含 2mol/L 尿素、4mmol/L 谷氨酰胺，和 2mmol/L PMSF 的 DMEM，37℃以 1r/min 的速度转动孵育 2h。
6. 在 8 个 50ml 聚碳酸酯离心管中 15 000*g*，4℃离心 15min 抽提纤连蛋白，保存含有纤连蛋白的上清，弃去沉淀。
7. 测量上清体积，按每毫升加入 0.472g 的比例，在冰上边搅动边加入超纯硫酸铵，当所有的硫酸铵都溶解后，冰浴静置 1h。
8. 用 50ml 聚碳酸酯离心管 15 000*g*，4℃离心 15min 收集沉淀的纤连蛋白。弃上清，轻轻且迅速地将所有沉淀物溶于总体积为 10ml 的 0.2mol/L CAPS 缓冲液，pH11.0。必要的话用 NaOH 调整 pH。
9. 用一个带盖的容器，在 3.5L CAPS/盐缓冲液中于 4℃搅动透析重溶的细胞的纤连蛋

白，更换两次透析液。

10. 在 4℃ 15 000g 离心 20min 使纯化好的纤连蛋白澄清。
11. 用 A_{280} 测定纤连蛋白的浓度，消光系数为 1.28ml/(mg·cm)，SDS-PAGE 分析。
    细胞纤连蛋白在 250kDa 处存在 1 条带。
12. 分装，并在液氮上冷冻。

备择方案 1 亲和纯化提取的细胞纤连蛋白

从细胞抽提的纤连蛋白通常不经进一步处理直接使用。然而这种材料可能污染有其他细胞蛋白，特别是在提纯纤连蛋白过程中使用了 2mol/L 的尿素，在这种情况下必须进一步纯化。

附加材料（见基本方案 2；带√项见附录 1）

√Tris 缓冲盐溶液（TBS）
白明胶-琼脂糖凝胶（Amersham Pharmacia Biotech）
5ml 硅烷化玻璃柱或聚丙烯柱

1. 从单层细胞中抽提细胞的纤连蛋白（见基本方案 2，步骤 1～6）。
2. 将 5ml 的琼脂糖凝胶装入硅烷化的玻璃柱或聚丙烯柱，用 2.5ml 含 8mol/L 尿素的 TBS 洗，再用 25ml 的 TBS 洗。
3. 将细胞的纤连蛋白按 1∶3 的比例用 TBS 稀释，使尿素的终浓度降为 0.5mol/L，将纤连蛋白加入亲和柱，每组 3ml 收集洗脱液。
4. 用 TBS 彻底洗柱结合的物质，检查洗脱液的 A_{280} 直到 $A_{280} < 0.05$。
5. 用含 8mol/L 尿素的 TBS 洗脱，每组 3ml 收集洗脱液，用 A_{280} 确定洗脱峰，合并保存洗脱下来的纤连蛋白。
6. 透析收集到的纤连蛋白洗脱液（见基本方案 2，步骤 9～12）。

备择方案 2 从条件培养基中纯化人细胞纤连蛋白

高密度培养的成纤维细胞能向培养基中释放大量的细胞纤连蛋白。

附加材料（见基本方案 2；带√项见附录 1）

无血清培养液：如 1∶1 DMEM/Ham's F12；替代物
白明胶-琼脂糖凝胶（Amersham Pharmacia Biotech）
重结晶 BSA（3×重结晶，CalBiochem）
√Tris 缓冲盐溶液（TBS）
超纯尿素（Life Technologies or Sigma）
√CAPS/盐
硫酸铵

2.5cm 聚丙烯柱或硅烷化的玻璃柱，5cm 高（用 Aquasil 硅烷化，Pierce）
1L 的圆柱状聚丙烯瓶
3ml 聚丙烯管

1. 将 2000ml 无血清培养液加温至 37℃，在 10 个滚动培养瓶中每个加入 50ml 预热的无血清培养液，轻轻漂洗，洗 4 次，每瓶加入 50ml 无血清培养液，37℃以 1r/min 的速度转动孵育 1h，洗去单层细胞中吸收的血清蛋白。
2. 弃去无血清培养液，每个滚动瓶加入 100ml 新鲜的无血清培养液，37℃以 1r/min 的速度转动孵育 24～48h。
3. 从瓶中收集无血清条件培养液，每 1000ml 条件培养液加入 10ml 0.2mol/L PMSF（终浓度 2mmol/L）。
4. 用聚丙烯离心管 25 000*g* 4℃离心 15min，保存上清，弃沉淀。
5. 准备白明胶-琼脂糖凝胶亲和柱。按每升条件培养液用 10ml 白明胶-琼脂糖凝胶的量装 2.5cm 聚丙烯柱或硅烷化的玻璃柱，用 30ml 含 5mg/ml BSA 的 TBS 洗白明胶-琼脂糖凝胶，再用 50ml 含 8mol/L 尿素的 TBS 洗柱，随后换用 50ml 的 TBS 洗柱。
6. 用 1L 的条件培养液混合 1ml 经 BSA 处理的白明胶-琼脂糖凝胶，4℃孵育 24h。
7. 让小珠沉淀，倒掉大部分的培养液，将白明胶-琼脂糖凝胶倒入 2.5cm 聚丙烯柱或硅烷化的玻璃柱，用 50ml 的 TBS 于室温冲洗柱结合物。
8. 用含 8mol/L 尿素的 TBS 洗脱，每组 3ml 收集洗脱液，用 A_{280} 确定洗脱峰，合并保存洗脱下来的纤连蛋白。
9. 如果从白明胶-琼脂糖凝胶亲和柱获得的细胞的纤连蛋白浓度＞1mg/ml，按步骤 11 操作；如果需要更高浓度的细胞纤连蛋白将洗脱的纤连蛋白用 3.5L CAPS/盐溶液透析并不断搅动，至少 3h，以除去大部分的尿素，至少更换两次缓冲液。
10. 将纤连蛋白转移到聚丙烯烧杯中，测量体积，按每毫升洗脱液加入 0.472g 超纯硫酸铵的量（70%饱和度）在冰上边搅动边加入，冰浴静置至少 1h，用聚丙烯离心管在 4℃ 15 000*g* 离心 15min 离心沉淀的纤连蛋白，弃上清，轻轻且迅速地将所有细胞纤连蛋白沉淀物溶于 pH 11.0 的 0.2mol/L CAPS 缓冲液。必要的话用 NaOH 调整 pH。
11. 在 3.5L CAPS/盐缓冲液中于 4℃搅动透析重溶的细胞的纤连蛋白，更换两次透析液，勿使透析物接触空气。
12. 在 4℃ 15 000*g* 离心 20min 使纯化好的纤连蛋白澄清。
13. 用 A_{280} 测定纤连蛋白的浓度，消光系数为 1.28ml/(mg・cm)，SDS-PAGE 分析。
    细胞纤连蛋白在 250kDa 处存在 1 条带。
14. 分装，并在液氮上冷冻。
    细胞的纤连蛋白在中性条件溶解性不好，最好储存于 pH 11.0 的溶液中。

参考文献：Engvall and Ruoslahti，1977；Hynes，1990；Mosher，1989
撰稿人：Steven K. Akiyama

单元 13.7 玻连蛋白的纯化

基本方案

警告：操作人血液、细胞或感染性媒介物必须依照适当的生物安全规范。即使是筛查过的人血清也应按可能污染有 HIV 或肝炎病毒等感染性媒介物对待。任何时候都应穿戴两层手套、安全眼镜或护目镜以及适当的防护服。应备有 10%的次氯酸钠漂白或含有碘的消毒剂如 Wescodyne 或 Providone 以在紧急情况下消毒任何溅出的血浆。

注意：本方案仅适用于使用柠檬酸盐抗凝而不适用于乙酰肝素抗凝的血浆或血清。因为玻连蛋白可以与玻璃结合，本方案使用的任何玻璃制品都需要硅烷化处理。可选择聚丙烯、聚碳酸酯或聚乙烯的装置（推荐使用聚丙烯但其他材料也可选用）。也可使用聚苯乙烯材料，比玻璃要好。

材料（带√项见附录 1）

琼脂糖凝胶 CL-4B（Amersham Pharmacia Biotech）
肝磷脂-琼脂糖凝胶（Amersham Pharmacia Biotech）
√磷酸盐/盐/EDTA 溶液
√2mol/L NaCl 溶于磷酸盐/盐/EDTA 溶液
约 400ml（1～2U）柠檬酸盐抗凝的人血浆或血清
√0.2mol/L EDTA pH7.0
√0.2mol/L PMSF
冰浴冷却的 95%乙醇
超纯尿素
含 8mol/L 尿素的磷酸盐/盐/EDTA 溶液（见磷酸盐/盐/EDTA 溶液配方）
含8mol/L 尿素和 2mol/L NaCl 的磷酸盐/盐/EDTA 溶液（见磷酸盐/盐/EDTA 溶液配方）
β-巯基乙醇
含 8mol/L 尿素和 0.3mol/L NaCl 的磷酸盐/盐/EDTA 溶液（见磷酸盐/盐/EDTA 溶液配方）
√Dulbecco 磷酸盐缓冲液（DPBS）
20ml 和 50ml（最低）2.5cm 直径的聚丙烯柱或硅烷化的玻璃柱
600ml 和 1000ml 聚丙烯烧杯
聚丙烯离心管
Whatman ＃2 滤纸
10ml 聚丙烯管
用 Aquasil 硅烷化的分光光度计石英比色皿
透析管（12 000～14 000MWCO）

1. 准备 2.5cm 直径，8ml 的 Sepharose CL-4B 先行柱，用 24ml 磷酸盐/盐/EDTA 溶液洗，放大本方案可增大柱的直径而不是高度。
2. 室温条件下准备 2.5cm 直径，20ml 的肝磷脂-琼脂糖凝胶柱，用 80ml 溶于磷酸盐/盐/EDTA 的 2mol/L NaCl 溶液洗，再用 80ml 磷酸盐/盐/EDTA 溶液洗。
3. 在 4℃条件下，每 400ml 柠檬酸盐抗凝的人血浆或血清加入 2.5ml 0.2mol/L EDTA 和 0.5ml 0.2mol/L PMSF，同时迅速搅动。
4. 血清作为起始材料直接进入步骤 5。使用血浆时，将其放入 600ml 冰浴中的聚丙烯烧杯中并逐渐加入 48ml 冰浴冷却的 95%乙醇并不断搅动，继续搅动 10min。
5. 将血浆或血清于 4℃，12 000*g* 离心 10min；弃沉淀，保留上清，于 4℃用 Whatman ♯2 滤纸过滤。
6. 将过滤后的血清平衡至室温，加到琼脂糖凝胶 CL-4B 先行柱上以除去任何能与填料珠非特异结合的血浆成分，所有的血浆都通过柱后用 20ml 磷酸盐/盐/EDTA 溶液洗柱，将洗涤液加到血浆中。
7. 将步骤 6 收集到的所有的过柱产物加到肝磷脂-琼脂糖凝胶柱上，所有的血浆都通过柱后用 50ml 磷酸盐/盐/EDTA 溶液洗柱，将洗涤液加到血浆中。
8. 在室温条件下将血浆放入一个 1000ml 的聚丙烯烧杯中，轻轻搅动的同时加入 384g 超纯尿素。然后用磷酸盐/盐/EDTA 溶液将血浆稀释到最终体积为 800ml，室温静置 1～2h。
9. 在静置尿素处理的血浆的同时，用 120ml 含 8mol/L 尿素和 2mol/L NaCl 的磷酸盐/盐/EDTA 溶液洗肝磷脂-琼脂糖凝胶柱，然后换用 120ml 的含 8mol/L 尿素的磷酸盐/盐/EDTA 溶液。

   尿素的水溶液在室温中不稳定，因此所有含有尿素的溶液必须每天新鲜配置，如果在同一天没有使用的话则抛弃。

10. 将步骤 8 所得尿素处理的血浆加到肝磷脂-琼脂糖凝胶柱上，流速小于 100ml/h。用 400ml 含 8mol/L 尿素的磷酸盐/盐/EDTA 溶液洗柱。
11. 在 200ml 含 8mol/L 尿素的磷酸盐/盐/EDTA 溶液中加入 140μl β-巯基乙醇，用 100ml 的该溶液洗柱后，再用 100ml 的该溶液洗柱。
12. 用 100ml 未添加 β-巯基乙醇的含 8mol/L 尿素的磷酸盐/盐/EDTA 溶液洗柱。
13. 用含 8mol/L 尿素和 0.3mol/L NaCl 的磷酸盐/盐/EDTA 溶液洗脱玻连蛋白，每组 10ml 收集，以硅烷化石英比色皿测定的 A_{280} 为标准，收集合并 $A_{280}>0.05$ 含有玻连蛋白的组分。
14. 在 4℃连续 3 天用 3.5L DPBS 透析高浓度的组分（$A_{280}>0.5$），每天更换缓冲液；在 4℃连续 3 天用 3.5L 10% DPBS（1 个体积的 DPBS 用 9 个体积的 H_2O 稀释）透析低浓度的组分，每天更换缓冲液。
15. 在 4℃，12 000*g* 离心 20min 使收集到的玻连蛋白澄清，收集上清。
16. 测量玻连蛋白的浓度，消光系数为 1.28ml/(mg·cm)，将 50μl 或 100μl 的玻连蛋白分装于不同的聚丙烯管中，冻干，标记使用的缓冲液、初始体积、每管中玻连蛋白的量，－80℃储存。

   当用去离子水重溶玻连蛋白时，对于用 10%DPBS 为缓冲液的玻连蛋白要用 1/10

体积的初始液体量的去离子水，这样可在正常的DPBS缓冲液中产生高浓度的玻连蛋白，重溶的玻连蛋白必要的时候可以高压灭菌。

储存的玻连蛋白一两年后会失活。

参考文献：Preissner，1991；Yatohgo et al.，1988

撰稿人：Steven K. Akiyama

单元 13.8 制备胶冻状的基质

注意：所有与活细胞接触的溶液及仪器都必须灭菌，需要根据不同情况使用适当的灭菌技术。

基本方案 1 制备Ⅰ型胶原基质

胶冻状的胶原基质需在用于细胞培养的同一天制备，与塑料和玻璃基质相比，Ⅰ型胶原基质可以使包括骨骼肌细胞、肝细胞在内的多种类型的细胞更好地生长、存活和分化。

材料

3～5mg/ml 溶于稀酸的Ⅰ型胶原（如 Vitrogen 100，胶原），置冰上
10×磷酸盐缓冲液，pH7.4（10×PBS，见溶液配方），或 10×培养基用盐（如 199 培养基，Life Technologies），置冰上
0.1mol/L NaOH，置冰上
0.1mol/L HCl，置冰上
稀释的乙酸：每升含 28.5ml 冰乙酸
灭菌去离子水
细胞
组织培养液，37℃
装在桶中的湿冰
培养皿

制备Ⅰ型胶原基质

1a. 使用预冷的溶液并将其置于冰上。将 8ml Ⅰ型胶原与 1ml 的 10×PBS，pH7.4 和 1ml 0.1mol/L NaOH 混合。需要的话用 0.1mol/L NaOH 和 0.1mol/L HCl 调 pH7.4，使用 pH 试纸或 pH 计用无菌操作技术测定 pH。

2a. 吸取适量的胶原加入培养皿（如 35mm 培养皿用 1ml），37℃孵育至少 1h。

3a. 使用前用无菌的蒸馏水漂洗干燥的凝胶和胶原层以除去盐分，像正常培养一样加入细胞和培养液。

在有些情况下，研究者可能希望在Ⅰ型胶原内培养细胞，这可以在细胞贴壁以后再铺胶原，或将细胞与液态的Ⅰ型胶原在形成凝胶前混合。

当细胞贴壁以后，用抹刀轻轻地沿胶原凝胶的边搅动可以得到漂浮的胶原凝胶，贴壁的成纤维细胞使用漂浮的Ⅰ型胶原时，凝胶会有收缩，肝细胞也能成功地用漂浮的胶原凝胶培养。

制备非凝胶态的Ⅰ型胶原基质

1b. 用乙酸或 0.1mol/L 的 HCl 将 3～5mg/ml 的胶原溶液稀释成 0.1mg/ml。
2b. 将适量的溶于乙酸中的 0.1mg 的胶原加入培养皿中。完全覆盖整个底部，风干过夜。
3b. 使用之前用无菌水漂洗胶原层，除去盐，按照正常细胞培养加入细胞和培养液。

基本方案 2　制备 Matrigel 基质

Matrigel 是基底膜的粗提物，是能够支持多种细胞分化的非常好的基层材料。

材料

Matrigel（从 Sigma 或 Becton Dickinson Labware 购买）
培养基用盐溶液，4℃（可选，用于制备软胶）
细胞
组织培养液，37℃
装在桶中的湿冰
培养皿

1. 在 4℃使 Matrigel 融化。
   可以通过在冰上或冰箱中过夜放置的方法使 Matrigel 融化，或者用手转动瓶子融化，切勿使溶液温度升高，那样它将形成凝胶且不可恢复。Matrigel 不应反复冻融，需要根据日常工作的需要分装成小份保存。
2. 在无菌的超净台中，吸取适量的 Matrigel 加入培养皿中。
   为最大限度地形成凝胶 Matrigel 需配成≥9mg/ml.
3. 盖上培养皿，在 37℃孵育 30～60min 使 Matrigel 形成凝胶。
4. 向培养皿中轻轻加入温热的培养基和细胞进行正常的细胞培养，将培养皿送入孵箱，经常观察细胞行为的变化。正常更换培养液，注意不要扰动凝胶层。

备择方案 1　在 Matrigel 基质中培养细胞

许多细胞依据接种在 Matrigel 的顶部或内部而呈不同程度的分化。

材料

Matrigel（从 Sigma 或 Becton Dickinson Labware 购买）
细胞

组织培养液，37℃
装在桶中的湿冰
培养皿

1. 在 4℃使 Matrigel 融化。
2. 常规细胞培养准备细胞。室温 170g 离心 5min 收集细胞，弃上清，轻弹沉淀使细胞分散，将装有细胞的管子插入湿冰中。加入适量的融化好的 Matrigel，混合，注意不要产生气泡，吸入培养皿中。
3. 盖上培养皿，在 37℃孵育 30～60min 使 Matrigel 凝结。
4. 向培养皿中轻轻加入温热的培养基和细胞进行正常的细胞培养，将培养皿送入孵箱，经常观察细胞行为的变化。正常更换培养液，注意不要扰动凝胶层。

备择方案 2　在体内使用 Matrigel 基质做血管发生检验和肿瘤生长试验

在动物皮下种植的 Matrigel 几个月后仍然呈栓状，只有极少量的细胞侵袭。然而，如果在注射之前 Matrigel 混有特定的成血管因子，可以观察到在一周之内就有相当多的内皮细胞侵袭到 Matrigel 栓子中。如果肿瘤细胞或剪碎的活检材料与冷的 Matrigel 混合并注入动物体内，可以观察到肿瘤侵袭和生长的范围增加。

注意：所有使用活动物的方案必须经研究院关怀与使用委员会审阅和批准，必须按照正式批准的程序饲养和使用试验动物。

材料

Matrigel（从 Sigma 或 Becton Dickinson Labware 购买）
C57BL6 小鼠，用于血管发生检验，或无胸腺裸鼠用于人肿瘤生长试验
用于血管发生检验和肿瘤样品的测试混合物
必要时用于解离肿瘤组织的蛋白酶（如胰蛋白酶或胶原酶）
血红蛋白检验试剂盒（如 Drabkin Reagent Kit，Sigma），或包括图像处理器（如 NIH Image）在内的组织学研究所需的辅助材料和设备
装在桶中的湿冰
培养皿
1～3ml 注射器
23～25G 注射针

1. 在 4℃使 Matrigel 融化。
2. 在冰上将 Matrigel 与血管发生检验的测试物混合，或者与细胞或打散的肿瘤碎片混合做肿瘤的皮下生长试验。

   1～5ng/ml 的碱性成纤维生长因子应加入到一些 Matrigel 栓子中作为阳性对照。
3. 将一个装有 23G 或 25G 针头的 1～3ml 注射器放在烧杯中置于冰上使其冷却。向注射器中装入 1ml Matrigel/测试复合物或 Matrigel/肿瘤细胞混合物。对血管发生检

验，用一只手紧紧抓住小鼠，将待测物注入靠近后肢的下腹部皮下，对肿瘤生长试验，将小鼠约束于盒中将待测物注射于背部上方皮下。注射后将针头在原位保持约30s，直到Matrigel变成凝胶，慢慢拔出针头，翻转针头尽量减少注射部位漏出的Matrigel量（无论如何都可能有少量的渗漏）。

4a. 皮下的血管发生检验：一周后处死小鼠，轻轻切除皮肤，能够清晰地看到附着在皮肤下面或肌肉层上的 Matrigel 块，取出 Matrigel 块。如果存在清晰可见的丰富血管，使用血红蛋白检验试剂盒测量血管的发生情况，否则使用组织学的方法。

组织学的方法是，固定栓子，用 Masson 三色法染色，使用图像处理器通过计数血管的数量和/或测量血管的占据面积定量分析血管发生。

4b. 肿瘤生长：肿瘤通常在两周后观察，但一些细胞如 NIH3T3，需要至少两个月。

参考文献：Elsdale and Bard，1972；Kleinman et al.，1986；Li et al.，1986
撰稿人：Hynda K. Kleinman

单元 13.9 制备培养的角膜内皮细胞和 PF-HR9 内胚层细胞分泌的细胞外基质

细胞的行为受基质的调控，细胞在基质上附着、迁移和增殖。因此组织培养的表面包被胞外基质或单独的胞外基质组分可以更好地模拟细胞在体内生长的微环境，促进细胞的黏附、增殖并表现出分化的功能。

注意：所有与活细胞接触的溶液和设备必须灭菌且使用无菌操作技术。除非特别说明培养时必须在饱和湿度、37℃、10％CO_2的培养箱孵育。某些培养液（如 DMEM）需要改变CO_2的水平以维持 pH7.4。

基本方案 制备牛角膜内皮细胞胞外基质（BCE-ECM）

主要组分包括胶原、蛋白聚糖、层连蛋白、纤连蛋白、接触素（entactin）和弹性蛋白。

材料（带√项见附录 1）

从新杀的牛取 10～20 只眼
95％（v/v）乙醇
√PBS
√补充成分的低糖 DMEM-10
重组人碱性成纤维生长因子（bFGF；Sigma）
√胰蛋白酶/EDTA 溶液
右旋糖酐 T40（Sigma）
√Triton/NH_4OH 细胞裂解液
庆大霉素（Life Technologies）
Fungizone（amphotericin B；Life Technologies）

18G 注射针头

10cm、6cm 和 35mm 组织培养皿

无菌的有沟探针（耳匙或匙状头部的压舌板）

100%湿度、37℃、10%CO_2（v/v）的培养箱

√10cm 白明胶包被的组织培养皿

1. 从当地屠宰场新杀的牛取 10～20 只眼，4℃转运或在室温条件下 24h 内处理。
2. 确保这些牛眼都有无划伤、薄的、结晶状的清亮的角膜。用 95%乙醇冲洗这些牛眼使角膜的外侧灭菌并破坏外侧的上皮细胞层。
3. 用 18G 注射针头刺穿每只牛眼角膜和巩膜的连接处，将解剖剪插入孔中，剥离出角膜，将内皮面朝上放到 10cm 组织培养皿中。
4. 用 PBS 轻轻地洗角膜除去残存的虹膜，虹膜看起来像小的黑色碎片，在剥离过程中可能贴附于角膜内皮面。
5. 用灭菌的有沟探针轻轻刮取角膜内皮，注意不要施加压力。
6. 将有沟探针在含有 5ml 补充成分的低糖 DMEM-10 培养液的 6cm 的组织培养皿中蘸几下以转移组织碎片，将步骤 5～6 重复 3 次。
7. 对所有剩余的角膜样品重复步骤 4～6，为每一个角膜都准备一个独立的原代培养，培养于 100%湿度、37℃、10%CO_2（v/v）的培养箱，除非偶尔在相差镜下检查，5 天之内不要动培养的细胞。
8. 在第 5～6 天用新鲜的培养基换液，并开始每隔一天按终浓度 1ng/ml 加入重组的 bFGF。
9. 第 8～12 天从 6cm 原代培养皿中吸走培养液，加入 2ml 胰蛋白酶/EDTA 溶液，37℃孵育 5min 或直到细胞变圆但还未从壁上脱离为止。
10. 吸走胰蛋白酶/EDTA 溶液，将细胞重新悬浮于 5ml 补充成分的低糖 DMEM-10 培养液，将 5ml 细胞悬液（约 1×10^6 个）转移到一个常规的或用白明胶包被的含有 5ml 补充成分的低糖 DMEM-10 培养液的 10cm 培养皿中。每隔一天按 1ng/ml 加入 bFGF 直到培养皿几乎长满（5×10^6～7×10^6 个/培养皿）。
11. 第一次传代培养后的 4～6 天（细胞几乎长满），吸走培养液，加入 5ml 胰蛋白酶/EDTA 溶液，37℃孵育 5min 或直到细胞变圆但还未从壁上脱离为止，吸走胰蛋白酶/EDTA 溶液，将细胞重新悬浮于 11ml 补充成分的低糖 DMEM-10 培养液。
12. 将 1ml 细胞悬液加到一个常规的或用白明胶包被的含有 10ml 补充成分的低糖 DMEM-10 培养液和 1ng/ml bFGF 的 10cm 培养皿中，共接种 11 个培养皿，每隔一天按 1ng/ml 加入 bFGF 直到培养皿几乎长满（5×10^6～7×10^6 个/培养皿）。
13. 准备 500ml 含 4%(v/v) 右旋糖酐 T40 和 1ng/ml bFGF 的补充成分的低糖 DMEM-10。
14. 吸走培养液，从 10 个 10cm 培养皿中消化收集细胞，加入 5ml 胰蛋白酶/EDTA 溶液，37℃孵育 5min 或直到细胞变圆但还未从壁上脱离为止。
15. 从每个培养皿中吸走胰蛋白酶/EDTA 溶液，将细胞重悬于 5ml 补充成分的低糖 DMEM-10，合并细胞悬液，将其加到 500ml 含 4%（v/v）右旋糖酐 T40 和 1ng/ml

bFGF 的补充成分的低糖 DMEM-10 中。

16. 将 2ml 细胞悬液（约 2×10^5 个）加到一个 35cm 培养皿中，共接种 200 个培养皿，每隔一天按 1ng/ml 加入 bFGF 直到培养皿几乎长满（通常需要 4～6 天），不更换培养液再培养 5～8 天。
17. 37℃预热 Triton/NH_4OH 细胞裂解液 10～20min，从每个 35mm 吸走培养液，加入 1ml 细胞裂解液，轻轻摇动室温孵育 3～5min，选择一个培养皿用相差显微镜检查，每个培养皿用 2ml 的 PBS 洗 4 次。
18. 将每个用胞外基质包埋的培养皿用补充了浓度为 50μg/ml 的庆大霉素和 0.25μg/ml 两性霉素（Fungizone）的 PBS 覆盖，4℃可以保存 4 个月。

备择方案　制备 HR9-ECM

与 BCE 细胞（牛角膜上皮细胞）不同，PF-HR9 细胞是自然的上皮，它们产生的胞外基质更像是上皮基底膜（不是 BCE 产生的亚内皮胞外基质）。这种胞外基质的主要成分是层连蛋白、entactin、Ⅳ型胶原和硫酸乙酰肝素蛋白聚糖（heparan sulfate proteoglycans），只有很少或没有纤连蛋白、Ⅲ型胶原、硫酸软骨素蛋白聚糖（dermatan sulfate proteoglycans），检验不到 bFGF。

附加材料（见基本方案；带√项见附录 1）

PE-HR9 细胞（ATCC；Chung et al. 1977；Kramer and Vogel 1984）
√补充成分的高糖 DMEM-10
抗坏血酸（Sigma）
青霉素
链霉素
√纤连蛋白包被的组织培养皿

1. 用补充成分的高糖 DMEM-10 在 10cm 培养皿于饱和湿度、37℃、10%CO_2 的培养箱培养 PE-HR9 细胞，用胰蛋白酶/EDTA 于 37℃消化 5min，使 PE-HR9 细胞分散，按 1∶10 每周传代一次。
2. 用胰蛋白酶/EDTA 于 37℃消化 5min，使 PE-HR9 细胞分散，洗涤并重悬于 100ml 补充成分的高糖 DMEM-10 中。
3. 每个纤连蛋白包被的 35mm 培养皿接种 2×10^5 个细胞，共 50 个培养皿，用含 4%右旋糖酐 T40 的补充成分的高糖 DMEM-10 培养。
4. 培养 5～6 天，在第 2 天、第 4 天按 50μg/ml 向培养基中加入抗坏血酸。
5. 37℃预热 Triton/NH_4OH 细胞裂解液 10～20min，从每个 35mm 吸走培养液，加入 1ml 细胞裂解液，轻轻摇动室温孵育 3～5min，选择一个培养皿用相差显微镜检查。
6. 每个培养皿用 2ml 的 PBS 洗 4 次，吸走可溶物，每个 35mm 培养皿加入补充了浓度为 50μg/ml 的庆大霉素和 0.25μg/ml Fungizone 的 1ml 的 PBS，4℃可以保存 4 个月。

支持方案1　细胞增殖检验

这个方案不适用于 HR9-ECM。

材料（带√项见附录1）

新屠宰的牛的主动脉组织

DMEM/BCS：补充成分的低糖 DMEM-10（见溶液配方），用 10%（v/v）小牛血清替代 FBS 和新生牛血清

√胰蛋白酶/EDTA 溶液

35mm 普通和 BCE-ECM（牛角膜上皮细胞胞外基质）包被的组织培养皿（见基本方案）

3.7%（w/v）甲醛（由市售 37%福尔马林配制）

√0.125%（w/v）结晶紫溶液

1. 按方案的要求从新鲜的动脉组织获得初始的主牛动脉内皮细胞克隆群体（BAEC），细胞用 DMEM/BCS 培养于饱和湿度、37℃、10% CO_2 的培养箱中。
2. 胰蛋白酶/EDTA 在 37℃孵育 5min，使储备培养物解离成单细胞悬液，用培养液洗。
3. 向两个 35mm 培养皿和两个 BEC-ECM 包被的组织培养皿各加入 2ml DMEM/BCS，每个培养皿接种 300 个细胞，CO_2 培养箱培养。
4. 接种后 10～12 天，吸走培养液，用 1ml 3.7%的甲醛室温固定 1h。
5. 用 1ml 0.125%的结晶紫溶液将培养物染色 5min，管道水漂洗，计数集落数。

支持方案2　细胞分化检验

这个方案不适用于 HR9-ECM。

材料（带√项见附录1）

PC12 细胞（ATCC）

√补充成分的高糖 DMEM-10

√胰蛋白酶/EDTA 溶液

35mm 普通和 BCE-ECM 包被的组织培养皿

1. 用补充成分的高糖 DMEM-10 将 PC12 细胞培养于饱和湿度、37℃、10% CO_2 的培养箱中。
2. 胰蛋白酶/EDTA 在 37℃孵育 5min，使培养细胞解离成单细胞悬液，用培养液洗。
3. 向 3 个普通 35mm 培养皿和 3 个 BEC-ECM 包被的组织培养皿中各加入 2ml 补充成分的高糖 DMEM-10，每个培养皿接种 1×10^5 个细胞，CO_2 培养箱培养。
4. 每天检查培养物是否长出神经突。

参考文献： Gospadarowicz et al.，1976；Vlodavsky et al.，1980，1993

撰稿人： Israel Vlodavsky

单元 13.10 制备培养的成纤维细胞产生的细胞外基质

成纤维细胞分泌并利用细胞外基质（ECM），提供它们黏附、迁移和组织形成所需的结构支持，除此以外细胞外基质还可以调节生长和生存等细胞功能。

注意： 所有与细胞接触的溶液和设备必须灭菌并使用无菌操作技术。除非有特别说明，培养孵育均是在饱和湿度、37℃，10% CO_2 的培养箱中。一些培养液（如 DMEM）需要调整 CO_2 的浓度以维持 pH7.4。

基本方案 制备培养的成纤维细胞产生的细胞外基质

材料（带√项见附录 1）

√组织培养的 NIH3T3 细胞
√胰蛋白酶/EDTA 溶液
√汇合培养基（confluent medium）
无水乙醇
√磷酸盐缓冲液（PBS）
√0.2%（w/v）白明胶溶液
√基质培养液
√抽提缓冲液，37℃
10U/ml DNase Ⅰ（Roch）溶于含 1mmol/L $CaCl_2$ 和 1mmol/L $MgCl_2$（可选）的 PBS（见溶液配方）
补充了 100U/ml 青霉素、100μg/ml 链霉素和 0.25μg/ml Fungizone 的 PBS（见溶液配方）
添加剂可从 Life Technologies 购得
15cm 组织培养皿
倒置相差显微镜
灭菌的小镊子（如 Dumont no. 4）
适当的产生基质的表面（下列之一）：
玻璃底 no. 1.5 板（MatTek）
装在 35mm 组织培养皿中的 22mm 环形高质量盖玻片（Carolina Biological Supply）
6 孔组织培养板或 35mm 培养皿

1. NIH-3T3 细胞在 15cm 培养皿中长到覆盖 80%面积的半汇合后，吸走弃去培养液，用胰蛋白酶/EDTA 简单漂洗细胞层。加入足量的胰蛋白酶-EDTA 溶液覆盖整个细胞层，迅速吸走过量液体，室温在倒置显微镜下观察直到细胞从培养皿上脱离（1～3min）。

2. 将 10ml 的汇合培养基加到培养皿内，轻轻摇动使胰蛋白酶消化好的细胞悬浮，收集细胞。
3. 将 2ml 细胞悬液加入 15cm 组织培养皿，培养两三天至半汇合度（覆盖率 80%）。
4. 可选择步骤（可要、可不要）：如果选用盖玻片作为成纤维细胞形成的三维结构的基质沉降表面，预先将盖玻片浸一下无水乙醇，再在火焰上烧一下以灭菌，放入 35mm 的培养皿中用 PBS 漂洗，用灭菌的小镊子操作（如 Dumont no. 4）。
5. 在成纤维细胞形成的三维结构的基质沉降的表面加 2ml 0.2%白明胶溶液，37℃孵育 1h，吸走液体加入 2ml PBS。
6. 按照第一部的方法用胰蛋白酶消化细胞。

这一方案适用于 NIH3T3 细胞，然而也可能适用于其他成纤维细胞系，如从这步开始可将相同的方案用于人类或其他成纤维细胞。

7. 将每个培养皿的细胞收集到 10ml 的基质培养液。计数细胞（单元 1.1），用基质培养液稀释至终浓度为 1×10^5 个/ml。
8. 从白明胶包被的培养皿中吸走 PBS，每个 35mm 的培养皿接种 2×10^5 个细胞培养 24h。
9. 24h 后吸走培养液，换上新的基质培养液。
10. 接种以后的 5～9 天每隔 48h 用新鲜配制的基质培养液换液，直到基质可以从细胞剥下。
11. 仔细吸走培养液，轻轻地用 2ml PBS 漂洗，漂洗时吸管靠着培养皿的壁但不要接触长有细胞的培养皿的底部，轻轻地加入 1ml 37℃预热的抽提缓冲液；
12. 用倒置显微镜观察细胞裂解的过程，直到没有完整的细胞（约 3～5min），加入 2～3ml PBS 稀释细胞碎片。
13. 尽可能小心地吸走细胞碎片（用吸管），但不要彻底吸光液体，重复稀释和吸走液体的过程。
14. 可选择步骤（可要、可不要）：为了尽量减少 DNA 碎片，用 2ml 10U/ml 的 DNase 在 37℃孵育 30min。孵育结束后，吸走含酶的溶液，用 PBS 洗两次。
15. 至少使用 3ml 补充了 100U/ml 青霉素、100μg/ml 链霉素和 0.25μg/ml Fungizone 的 PBS 覆盖基质包被的板（或盖玻片），用封口膜密封，4℃可以保存 2～3 周。
16. 使用倒置显微镜在使用前确认基质的完整性，基质应该贴附在培养面上且无细胞碎片。

支持方案 1　细胞附着检测

材料（带√项见附录 1）

培养于 15cm 培养皿的，半汇合度的（人或鼠）成纤维细胞（见基本方案，步骤 1～3）

√汇合培养液（confluent medium）

√Hoechst 33342 储备液

√室温和4℃的磷酸盐缓冲液（PBS）
√胰蛋白酶/EDTA溶液
√固定液
15ml圆锥底聚丙烯离心管
配有适合15ml圆锥底离心管转头的组织培养离心机
翻动（液体能上下颠倒混合）式摇床
3个带有成纤维细胞来源的三维结构的基质的玻璃底no. 1.5培养板（见基本方案）
3个带有预先包被好的二维纤连蛋白的玻璃底no. 1.5培养板（见溶液配方，还可见支持方案3和4）
带有适当的照相机和滤光片的倒置荧光显微镜以检查Hoechst 33342（见附录）
可以进行目标计数的图像分析软件（可选，如MetaMorph from Universal Imaging）

1. 从半汇合度的（细胞覆盖率80%）长有（人或鼠）成纤维细胞的15cm的培养皿吸走培养液，加入20ml含有40μl Hoechst 33342的汇合培养液，37℃孵育5min。
2. 用PBS洗细胞4次。
3. 加入足以覆盖细胞层的胰蛋白酶/EDTA溶液，迅速吸走过量的液体，在倒置显微镜下观察，直到细胞脱离培养皿（约1～3min)。
4. 将10m的汇合培养液加入培养皿，轻轻摇动使胰蛋白酶消化下来的细胞悬浮，将其转移到15ml圆锥底聚丙烯离心管，分出一小部分细胞计数（单元1.1），室温100*g*离心5min，弃去上清，用汇合培养液按3.5×10^5个/ml重悬细胞。
5. 翻动式摇床37℃摇20min。
6. 仔细地将150μl细胞悬液滴加到每个三维结构的基质包被的培养皿或纤连蛋白二维包被的玻璃底上，37℃孵育10min。
7. 将培养皿移出孵箱，轻弹培养皿使包含有未贴壁细胞的培养液滴由培养皿的玻璃部分移到塑料部分，然后吸走液滴。
8. 缓慢加入4℃预冷的3ml PBS（到每个培养皿的塑料部分），漂洗培养皿，轻轻吸走PBS，加入2ml固定液，室温固定20min。
9. 吸走固定液，室温条件下加入2ml PBS。
10. 使用倒置荧光显微镜，用12×或20×物镜在每个培养皿随机拍摄5张有细胞核的照片，计数Hoechst 33342染色细胞核。

支持方案2 确定细胞的形状

材料（带√项见附录1）

√2%（w/v）BSA，热变性
√磷酸盐缓冲液（PBS）
培养于15cm培养皿的半汇合度的（人或鼠）成纤维细胞（见基本方案，步骤1～3）
√胰蛋白酶/EDTA溶液

√汇合培养液

√4μg/ml DiI 工作液（用汇合培养液配制）

√固定液

Gel Mount 封片液（Biomeda）

3 个用成纤维细胞起源的三维结构的基质包被的盖玻片（见基本方案）

√3 个用二维基质预先包被好的盖玻片（见支持方案 3 和 4）

35mm 组织培养皿或 6 孔板

灭菌小镊子（如 Dumont no. 4）

15ml 圆锥底聚丙烯离心管

能使液体上下颠倒混合的翻动式摇床

配有适合 15ml 圆锥底离心管转头的组织培养离心机

玻璃显微镜载玻片

带有数码相机的荧光显微镜

能够测量椭圆傅里叶参数的图像分析软件（如 Metamorph from Universal Imaging）

1. 仔细将用成纤维细胞来源的三维结构的基质包被的盖玻片和对照组（用二维基质预先包被好的盖玻片）放入 35mm 培养皿或 6 孔板中，基质面朝上。用灭菌小镊子（如 Dumont no. 4）操作盖玻片。加入 2ml 热变性的 BSA 在 37℃孵育 1h，封闭非特异性结合位点。
2. 所有封闭的盖玻片用 2ml PBS 洗。
3. 从半汇合度的（细胞覆盖率 80%）长有成纤维细胞的 15cm 的培养皿吸走培养液，用胰蛋白酶/EDTA 溶液漂洗一下细胞层，加入足以覆盖细胞层的胰蛋白酶/EDTA 溶液，迅速吸走过量的液体，室温条件下在倒置显微镜下观察，直到细胞脱离培养皿（约 1～3min）。
4. 将 10ml 含 4μg/ml DiI 汇合培养液加入培养皿中轻摇，重悬消化下来的细胞，将细胞悬液转移到 15ml 圆锥底聚丙烯离心管中，加入染料，37℃转动孵育 30min。
5. 室温 100g 离心 5min，弃去上清，用汇合培养液将细胞重悬，终体积为 10ml。再重复 4 次以除去任何残存的染料。
6. 计数细胞（单元 1.1），用汇合培养液稀释到 1×10^4 个/ml。
7. 仔细从盖玻片上吸走 PBS，向每个装有盖玻片的培养皿中加入 2ml 稀释好的细胞悬液，37℃孵育 5h。
8. 吸走培养液，用 PBS 漂洗，吸走 PBS，室温下用 1ml 固定液固定 20min。
9. 吸走固定液，用 PBS 漂洗，再用水漂洗消除残存的盐。
10. 仔细地拿出盖玻片，将其一端与纸巾接触以除去过量的液体，将一滴 Gel Mount 封片液滴在玻璃盖玻片的一角上，细胞面朝下封片，封好片后样品室温避光干燥 1h。
11. 拍摄荧光数码照片，轻微过曝光以显示细胞的轮廓（波长信息见附录 2D）。
12. 使用图像分析软件测量长度（胞体最长扩展范围）和宽度（测径器宽度）。

制备二维细胞外基质对照

由类似体内成纤维细胞来源的三维结构的基质诱导特定细胞效应的原因是基质的三维分布、基质分子组成或二者都有。下面两个支持方案提供了获得与三维结构的基质相同分子组成的二维对照的方法。

支持方案 3 成纤维细胞来源的三维基质的机械压缩

材料（带√项见附录 1）

强力胶水

√磷酸盐缓冲液（PBS）

在 22mm 盖玻片上的成纤维细胞来源的基质（见基本方案）

配有水平环的环形架

能够放得下环的平台面（见图 13.10.1）

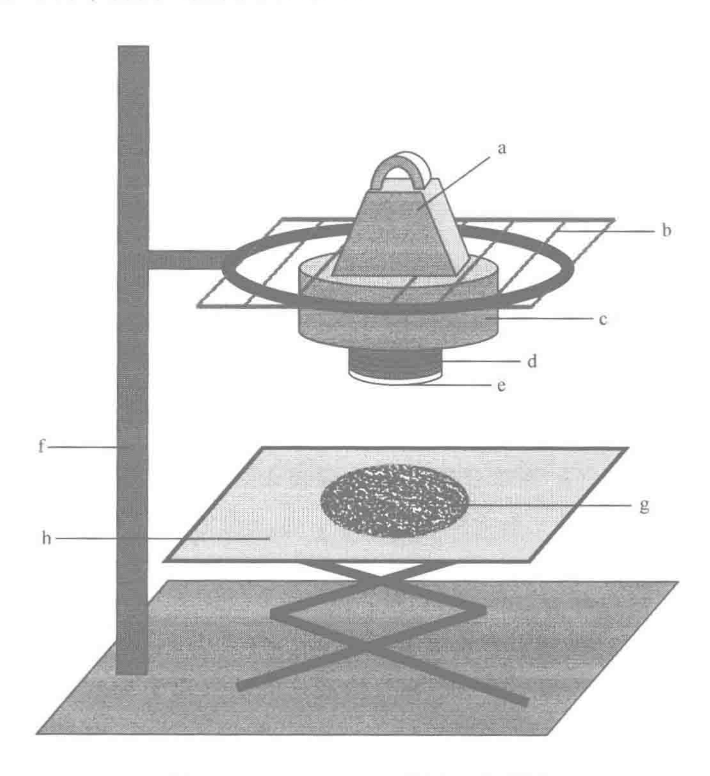


图 13.10.1 机械压缩装置组成简图

a. 重物；b. 平台面；c. 垫圈；d. 12mm 盖玻片；e. Teflon 膜；f. 环支架；g. 需要机械压缩的成纤维细胞来源的三维结构的基质；h. 实验升降台

合适大小的隔片，宽度小于环的直径，高度比环深（见图 13.10.1）

12mm 圆形盖玻片（Carolina Biological Supply）

灭菌小镊子（如 Dumont no. 4）

软木钻孔器

Teflon 膜：保护层由 0.001in FEP 膜和其下的 0.008in 乙烯基膜组成，带有黏性背胶（用于覆盖试验台面，Cole-Parmer）

备有紫外灯管的生物安全柜（可选）

实验升降台（Fisher）

重物（约 158g）

35mm 组织培养皿

倒置相差显微镜

1. 用强力胶水将平台面黏到隔片上，使平台面放到环上时能从环的底部突出来一些（图 13.10.1）。
2. 将 4 个盖玻片叠起来黏到垫圈的末端，使隔片延伸，用灭菌小镊子（如 Dumont no. 4）操作盖玻片，让强力胶水充分干燥。
3. 用软木打孔器从 Teflon 膜上切下一个直径 12mm 的圆片。
4. 用 Teflon 圆片盖住最后一片盖玻片。
5. 将 Teflon 圆片的表面在生物安全柜中用紫外灯照射几个小时以灭菌。
6. 将 Teflon 向下将黏好的平台面和垫圈放到支架的环形部分。
7. 将升降台的上表面用封口膜包好放在环下。
8. 将重物放在平台面上调整环，使 Teflon 膜的面刚好与升降台表面平行。
9. 将成纤维细胞来源的三维结构的基质包被的盖玻片的基质面向上，放在 Teflon 膜下方的升降台上。
10. 慢慢升高升降台使基质面与 Teflon 膜接触并使平台面离开环形支架升起，维持 2min。
11. 慢慢放下升降台，使平台面回到环形支架上，被压缩的基质从 Teflon 膜上分离。
12. 将带有被压缩了的基质的盖玻片放到 35mm 培养皿内，小心地加入 2ml PBS 用相差显微镜检查，以确认被压缩基质的完整性。

支持方案 4　成纤维细胞来源的三维结构基质的溶解

材料

35mm 培养皿中成纤维细胞来源的三维结构的基质（见基本方案）

溶解试剂：含有 10mmol/L 二硫苏糖醇的 5mol/L 的胍（无限期地保存于 4℃）

橡皮刷

上下旋转仪

1. 从基质包被的培养皿吸走 PBS，将培养皿在实验台上倾斜 30°约 1min，使多余的 PBS 汇集到培养皿的另一端，小心吸走 PBS 不要使基质层剥离。
2. 将培养皿置冰上，加入 300μl 溶解试剂，冰浴 5min。
3. 用橡皮帚向培养皿的一侧刮，将混合物吸到一个 1.5ml 的离心管，再向管中加入

200μl 溶解试剂，4℃转动 1h。

4. 在小型离心机（microcentrifuge）内以最大速度于 4℃离心 15min，将上清转移到一个新的微量离心管，4℃储存。

   平均蛋白浓度为 1～3mg/ml

参考文献：Cukierman et al.，2001

撰稿人：Edna Cukierman

单元 13.11　蛋白聚糖的分离和分析

警告：使用放射性材料时采用适当的措施避免污染实验者和周围环境。在适当的指定区域内倾倒实验废物，并且遵守当地放射安全办公室的有关规则。

注意：即使可能收集到化学量的蛋白聚糖，加入痕量的放射性标记的物质有助于监测纯化的过程。在没有放射性标记的情况下，根据 1，9-二甲基甲烯基蓝（一种阴离子染料）能与硫酸葡聚糖胺结合而设计的商业化的检验方法可用于监测分离（如 Blyscan Glycosaminoglycan Assay，Biocolor；Accurate Chemical and Scientific）。

注意：所有与活细胞接触的溶液和设备必须灭菌且使用无菌操作技术。除非特别说明，培养时必须在饱和湿度、37℃、10% CO_2 的培养箱孵育。一些培养液（如 DMEM）需要改变 CO_2 的水平以维持 pH7.4。

基本方案 1　从培养细胞分离蛋白聚糖

材料（带√项见附录 1）

培养于 10cm 培养皿中的放射性标记的培养细胞（见支持方案）

√PBS

超纯尿素

√带有和不带有 Triton X-100 的溶解缓冲液

1. 将放射性标记的培养细胞的上清倒入一个 50ml 的圆锥底离心管，用 4ml PBS 洗细胞层，共两次，将洗液加入同一离心管，室温 800*g* 离心上清 10min，除去所有的细胞物质，将固体的尿素加入上清至终浓度为 4mol/L。上清 4℃保存，不要冷冻，尽快分析。
2. 细胞层用 20ml PBS 洗两次以除去多余的同位素标记物。向培养皿中加入 2ml 溶解缓冲液，刮松细胞，将悬液转移到 15ml 圆锥底离心管，用 2ml 溶解缓冲液，顺序冲洗细胞层和刮刀两次，将这些洗涤液加到同一离心管中，冰浴 30min，偶尔剧烈摇动。
3. 室温 800*g* 离心 10min，将上清倒入一个 100ml 量筒，用不含 Triton X-100 的溶解缓冲液按 1∶5 稀释，使去垢剂的浓度下降为 0.2%，4℃保存，不要冷冻，尽快分析。

备择方案　分离蛋白聚糖库

蛋白聚糖可能溶解在培养液的上清中、掺入不溶性的基质中、贴附于细胞表面或跨膜成分中，其中的一些可能连接细胞骨架和细胞外基质。

附加材料（见基本方案1；带√项见附录1）

无血清培养液

磷脂酰肌醇特异性磷脂酶C（PI-PLC；Boehringer Mannheim，Molecular Probes）

√含有和不含有去垢剂的裂解液

1. 用20ml PBS将放射性标记的培养细胞单层洗两次，用含有0.1mU PI-PLC的无血清培养液于37℃孵育1h以释放所有的糖基磷脂酰肌醇连接的蛋白聚糖。
2. 上清倒入15ml圆锥底离心管，用2.5ml不含有酶的无血清培养液将细胞层洗两次，将洗涤液倒入同一离心管中，加入终浓度为4mol/L的固体尿素，摇动使其溶解，置于冰上待用。尽快（24h内）浓缩和纯化（步骤6）。
3. 在培养皿中加入2ml裂解液，37℃孵育15min，将裂解液移入15ml圆锥底离心管，用1ml裂解液洗细胞层两次，将洗涤液加入管中，加入终浓度为4mol/L的固体尿素，摇动使其溶解。
4. 按1∶1加入不含去垢剂的裂解液，使去垢剂的终浓度降为0.1%，冰浴待用，尽快（24h内）浓缩和纯化（步骤6）。

   这是裂解的产物，包含没有连接到细胞骨架或基质的被滞留的疏水性蛋白聚糖和正在降解或合成的蛋白聚糖。
5. 4℃用20ml PBS将培养皿洗3次，加入1ml溶解缓冲液将细胞残余物刮入溶液中，按1∶10用不含去垢剂的溶解缓冲液稀释，使去垢剂的浓度降到0.1%，冰浴待用，尽快（24h内）浓缩和纯化（步骤6）。

   这一部分包括连接到细胞骨架和基质中的疏水性蛋白聚糖和基质蛋白聚糖。
6. 用DEAE-Sephacel色谱法浓缩分离所有的三份样品（见基本方案2）。

支持方案　$^{35}SO_4$ 或 ^{3}H 葡萄糖胺标记蛋白聚糖

因为葡聚糖胺链（除透明质酸）通常是高度硫酸化的，能用代谢法标记。接种细胞时向培养液中加入40μCi/ml $H_2^{35}SO_4$（1050～1600Ci/mmol；NEN Life Sciences），使细胞生长至亚汇合度（如95%）。不应使用不含硫酸盐的培养液，因为这似乎不能增加放射性标记物的掺入，或许是因为硫酸盐的量受限制造成的。培养液不应用硫酸链霉素做抗生素，这会增加未标记的硫酸盐。如果上清不需要作分析，在收获细胞后它可用于下一批细胞的标记。

葡萄糖胺衍生物可被掺入到葡聚糖胺中，因此［^{3}H］葡萄糖胺（40～60Ci/mmol；Amersham）用于放射标记蛋白聚糖和透明质酸。可在细胞接种时加入10μCi/ml［^{3}H］

葡萄糖胺，使细胞生长至汇合。

基本方案 2　二乙氨乙基-葡聚糖纤维素进行蛋白聚糖的阴离子交换层析纯化

材料（带√项见附录 1）

蛋白聚糖样品（见基本方案 1 或备择方案）
二乙氨乙基-葡聚糖纤维素（DEAE-Sephacel）：PBS 配成 50∶50（v/v）的悬液
√PBS
√DEAE-Sephacel 平衡缓冲液
来源于感兴趣细胞系的条件培养液（与细胞孵育了 24～48h）
√DEAE 低 pH 缓冲液
√DEAE 洗脱液
2cm×0.5cm 微型柱

1. 将 50∶50 的 DEAE-Sephacel 和 PBS 悬液装入 2cm×0.5cm 微型柱，柱床体积2～3ml。
2. 在柱上部安装输入管，连到装 PBS 的容器上，依靠重力或用泵以 16ml/h 的流速，10 倍柱床体积的 PBS 洗柱。
3. 用 2 倍柱床体积的 DEAE-Sephacel 平衡缓冲液平衡柱。
4. 用 20ml 细胞系的条件培养液上柱，按步骤 2 的方法调整柱状态，使用储液池或从适当的容器上安装管道。
5. 每次用 5ml DEAE-Sephacel 平衡缓冲液，洗柱 2 次。
6. 每次用 5ml DEAE 低 pH 缓冲液，洗柱 2 次。
7. 每次用 5ml DEAE 洗脱液，洗柱 2 次。
8. 按步骤 3 重新平衡柱。
9. 将蛋白聚糖样品上柱，体积大时在 4℃操作。
10. 重新按步骤 5、6 洗柱。
11. 使用 10 份（每份 1ml）的 DEAE 洗脱缓冲液洗脱。
12. 如果是代谢法标记的话使用放射性标记监测洗脱过程，否则用染料结合检验。合并含有蛋白聚糖的组分，4℃保存，勿冷冻。

    分离到的蛋白聚糖可用新的缓冲液透析或沉淀浓缩，选择缓冲液重新溶解。

基本方案 3　按大小排阻的层析法分析蛋白聚糖

材料（带√项见附录 1）

Sepharose 4B（Pharmacia）
√SEC 流动缓冲液
√蛋白聚糖样品

染料储备液：每种 1mg/ml 的右旋糖酐蓝（Sigma）和 *N*-2，4-二硝基苯酚（DNP）-丙氨酸（Sigma）

90cm×1cm 柱

柱泵

1. 按制造商的说明，准备含有 70ml 柱床体积的 Sepharose 4B 装 90cm×1cm 柱，以流速 9ml/h 用 SEC 流动缓冲液装柱。将流速减到 6ml/h。
2. 移走柱的上盖，让液体流下直到顶部凝胶刚刚变干，加入最大体积为 1ml 的蛋白聚糖样品（8000～10 000cpm）进行分析，让样品流入凝胶，立即加入 2ml SEC 流动缓冲液洗凝胶的顶部，直接移去洗涤液。
3. 更换柱的上盖，用柱泵控制流速为 6ml/h 收集 8 个 1ml 的组分，用放射性标记或染料结合检验法监测洗脱成分。通过含右旋糖苷蓝（高分子质量，完全排阻）和 DNP-丙氨酸（低分子质量，完全吸纳）的同时洗脱混合液体（800μl 样品混入 200μl 混合染料），或比较先前使用这些染料的走柱结果，确定排阻体积（V_0）和总吸纳体积（V_t）。
4. 用公式 $K_{av}=(V_s-V_0)/(V_t-V_0)$确定相对洗脱系数（$K_{av}$），公式中 V_s 是包含蛋白聚糖峰的组分的洗脱体积。

基本方案 4　碱性消除法分析葡聚糖胺的大小

以碱性消除所有的蛋白质，留下了解离的完整葡聚糖胺。

材料

蛋白聚糖样品

乙醇（可选用）

1mol/L NaOH/2mol/L $NaBH_4$

10mol/L 乙酸

透析管，MWCO 12～12 000（可选用）

1a. 透析法：用 MWCO 12～12 000 的透析管将蛋白聚糖样品对 100 倍体积水在 4℃透析 24h 以上，换 3 次透析液，将蛋白聚糖样品的溶剂转为蒸馏水。

1b. 沉淀法：在－20℃用 4 倍体积的 80％乙醇沉淀蛋白聚糖样品，用 80％乙醇洗，空气干燥，重溶于 0～5ml 蒸馏水。

2. 加入等体积的 1mol/L NaOH/2M $NaBH_4$，4℃孵育 16h。
3. 用 10mol/L 的乙酸中和直到 pH≈7.0。
4. 如果需要重新浓缩，重新用乙醇沉淀，溶于水中。
5. 直接用大小排阻色谱（单元 6.3）或 HPLC 分析 GAG 的大小。

基本方案 5　用木瓜蛋白酶消化法分析葡聚糖胺的分子质量

木瓜蛋白酶消化降解蛋白质核心，留下了完整的葡聚糖胺。

材料（带√项见附录 1）

蛋白聚糖样品
√木瓜蛋白酶消化缓冲液
20mg/ml 木瓜蛋白酶（Sigma）
65℃水浴

1. 将蛋白聚糖样品转移到木瓜蛋白酶消化缓冲液（见基本方案 4，步骤 1a 或 1b），用 2mg/ml 的木瓜蛋白酶在 65℃孵育 16h。
2. 直接用大小排阻色谱（单元 6.3）或 HPLC 分析 GAG 的大小。

基本方案 6　用裂解酶降解葡聚糖胺，分析葡聚糖胺的含量和蛋白核心

这种分析用酶来选择性地降解葡聚糖胺（glycosaminoglycan），肝素酶（heparinase）Ⅲ能降解硫酸肝素葡聚糖胺（heparin sulfate glycosaminoglycan）。软骨素酶（chondroitinase）ABC 裂解酶能够降解各种类型的软骨素和硫酸皮肤素葡聚糖胺（dermatan sulfate glycosaminoglycan）。软骨素酶 ACⅡ裂解酶能降解软骨素，但不能降解硫酸皮肤素葡聚糖胺。软骨素 B 裂解酶能降解硫酸皮肤素。

材料（带√项见附录 1）

蛋白聚糖样品
软骨素酶缓冲液
肝素酶Ⅲ缓冲液
硫酸软骨素 C 型或 B 型（Chondroitin-6-sulfat 或 dermatan sulfate；Sigma）
软骨素酶 ABC（EC 4.2.2.4），ACH（EC 4.2.2.5），或 B（无 EC 号）（Seikagaku America）
肝素酶Ⅲ（a.k.a heparitinase 或 heparitinaseⅠ；EC 4.2.2.8；Seikagaku America）

软骨素酶处理

1a. 将蛋白聚糖样品转移到软骨素酶缓冲液（见基本方案 4，步骤 1a 和 1b）。
SEC 或 HPLC 的使用量为 0.1～0.5ml（放射性标记时≥2000cpm）
2a. 加入约 2μg C 型硫酸软骨素作为软骨素酶 ABC 或 ACⅡ的载体，或使用 B 型软骨素作为软骨素酶 B 的载体。
3a. 加入 0.5～1mU 软骨素酶 ABC 、ACⅡ或 B，37℃孵育 2～5h。
4a. 用大小排阻层析法（size-exclusion chromatography）或 HPLC（降解的材料将以 Vt 的

体积被洗脱下来）检测葡聚糖胺的消化情况，或者使用免疫印迹的方法（单元 7.7）。

肝素酶Ⅲ处理

1b. 将蛋白聚糖样品转移到肝素酶Ⅲ缓冲液（见基本方案 4，第 1a 和 1b）。
SEC 或 HPLC 的使用量为 0.1～0.5ml（放射性标记时≥2000cpm）

2b. 如果蛋白聚糖的量很低用 2～5μg 硫酸肝素作为载体。

3b. 加入 1～2mU 肝素酶Ⅲ，37℃孵育。

4b. 用大小排阻层析或 HPLC（降解的材料将以 V_t 的体积被洗脱下来）检测葡聚糖胺的消化情况，或者使用免疫印迹的方法（单元 7.7）。

基本方案 7 用硝酸处理法降解硫酸乙酰肝素

警告： 因有亚硝酸铵放出，操作必须在化学通风橱中进行。

材料

1mol/L H_2SO_4
0.114g /ml Ba $(NO_2)_2$
蛋白聚糖样品
10mol/L NaOH

1. 将1ml 1mol/L H_2SO_4(0.05mmol)和1ml 0.114g /ml $Ba(NO_2)_2$混合，置冰上 10min，偶尔摇动，4℃ 500*g* 离心 2min 除去 $BaSO_4$ 沉淀，保存上清（硝酸）。
2. 将样品和硝酸按 1∶4 混合，置冰上 2h，用 10mol/L 的 NaOH 中和，用 pH 试纸检查 pH≈7.0。
3. 用大小排阻色谱或 HPLC（降解的材料将以 V_t 的体积被洗脱下来）检测硫酸乙酰肝素的消化情况，或者使用免疫印迹的方法（单元 7.7）。

基本方案 8 分析葡聚糖胺的类型和核心蛋白

用标准的 SDS-PAGE（单元 7.1）和免疫印迹（单元 7.7）方法可以分析 GAG 的类型并且鉴定核心蛋白。这些方法可以不用分离和纯化蛋白聚糖直接分析全细胞或条件培养液，也可以用来分析纯化了的蛋白聚糖。经裂解酶处理后在蛋白核心上残存的碳水化合物可用商品化的抗体检测到。有抗带有硫酸软骨素的消化过的硫酸肝素和葡聚糖胺的单克隆抗体（Seikagaku America），无论这些硫酸软骨素的 4 位或 6 位的半乳糖胺残基是硫酸化的（Δdi-4s 或 Δdi-6s）还是非硫酸化的（Δdi-0S），这些方法可以检测出含有这些特殊糖类的所有的蛋白核心。特殊的蛋白聚糖也可以用核心蛋白特异性的抗体检查到。经 SDS-PAGE 分析，代表了核心蛋白的不连续的多肽的外表特征决定了蛋白核心上存在有哪种类型的葡聚糖胺，同时可见，用特异性的裂解酶处理后完整蛋白聚糖在高分子质量区的抹布样特征的减少。

硝酸纤维素膜可以用于免疫印迹，但是完整的蛋白聚糖很难转移上去。由于这种方法依赖酶水解后去糖基化的核心蛋白的分辨率，因此完整蛋白聚糖的低转移效率可能并不十分重要。然而带阳离子的膜可以用来更高效地捕获完整的蛋白聚糖。

放射性标记的蛋白聚糖的大小排阻色谱法也能被用来分析蛋白聚糖的组成。使用Sephadex G-50 柱，完整的葡聚糖胺（GAG）将被洗脱到 V_0（相），相反，经酶处理后释放的二糖将被洗脱到或接近于 V_t（相）。不同处理的敏感性提示样品中葡聚糖胺的类型（和相对含量）。如果有 HPLC 设备，也可以使用 TSK 4000 HPLC 柱。

基本方案 9　分析葡聚糖胺的大小

材料（带√项见附录 1）

√HPLC 运转缓冲液（running buffer）
酶法或化学法处理的蛋白聚糖样品
DEAE-Sephacel 柱
PD-10 凝胶过滤柱（Amersham Pharmacia Biotech）
带有 TSK 4000 柱的高效液相层析

1. 按上文所述的处理方法从完整的蛋白聚糖分离完整的葡聚糖胺链，即用阴离子交换色谱法在 DEAE-Sephacel 柱上分离。
2. 根据制造商的说明用 PD-10 凝胶过滤柱将样品脱盐，使用蒸馏水作为缓冲液，冻干。
3. 用 HPLC 运转缓冲液平衡 TSK-4000 HPLC 柱。
4. 将样品溶于 HPLC 运转缓冲液，将 100～500μl 样品上柱，以 0.5ml/min 流速洗脱，按 0.5ml 每支分步收集。
5. 用测量放射性活性或染料结合试验检验每支样品。

基本方案 10　蛋白聚糖的免疫沉淀

虽然有一些基质蛋白聚糖能用标准的方法免疫沉淀（单元 8.5），但尚存在一些特殊的问题。首先蛋白聚糖的疏水性是一个要考虑的问题，特别是在需要分析与其相关的成分时（Oh et al.，1997）。就像在其他膜受体研究中观察到的那样，使用不同类型的去垢剂会导致免疫共沉淀结果的不同（Serru et al.，1999）。第二，葡聚糖胺链会限制针对核心蛋白的抗体去识别核心蛋白。在使用一抗和二抗后接着使用固定化的蛋白 A 可能会提高产量。另一个可以选择的办法是免疫沉淀之前用酶消化的方法除去葡聚糖胺链，一些蛋白聚糖在除去葡聚糖胺链后可能会聚集而形成沉淀。

互联网资源

www.glycoforum.gr.jp

参考文献：Callagher，1997；Lozzo，1998；Lindahl，et al.，1998

撰稿人：Anne Woods and John R. Couchman

单元 13.12 基质金属蛋白酶

基本方案 1 活细胞的胶原纤维的溶解和降解

本方法是用来研究在各种特定条件下活细胞产生的金属蛋白酶降解Ⅰ型胶原纤维的功能。Ⅰ型胶原纤维对基质金属蛋白酶（MMP）引起的断裂与溶解的敏感性是限制性的，这使它成为研究从开始时细胞因子、生长因子和其他代谢产物活化细胞表面受体，到酶催化的底物的裂解、溶解和最终处置这一系列活细胞介导的胶原纤维溶解过程中反应的顺序或组成的理想研究对象。

材料（带√项见附录 1）

3mg/ml 溶于 13mmol/L HCl 的大鼠尾腱Ⅰ型胶原
13mmol/L HCl
√中和缓冲液，4℃
√含100U/ml 青霉素 G 和 100μg /ml 硫酸链霉素的无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的磷酸盐缓冲液（CMF-PBS）待研究细胞（如成纤维细胞、角化细胞或肿瘤细胞）
√含有和不含有 10%FBS 的添加了 100U/ml 青霉素 G 和 100μg /ml 硫酸链霉素的 DMEM 培养液（或适合细胞类型的其他培养液）
生长因子/细胞因子：如 IL-1β、TNF-α、TGF-α 或 TPA，或佚波脂（phorbol ester）（12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate，TPA，或 phorbol myristate acetate，PMA）
1%（v/v）Triton X-100
0.5%（w/v）胰蛋白酶/0.53mmol/L EDTA (Invitrogen)
√考马斯蓝染料
6 孔细胞培养板

1. 为制备一个 6 孔板，需于 4℃将 1ml Ⅰ型胶原储备液（3mg/ml）用 7ml 13mmol/L HCl 稀释，将胶原溶液与 2ml 冷的中和缓冲液在预冷的试管中混合，轻轻地上下吹吸或者轻轻地将试管颠倒几次，以避免产生气泡（气泡会使胶冻产生缺陷）。
2. 混合后立即向 6 孔板的每孔中加入 1.5ml 中和好的胶原溶液。摇动培养板使胶原溶液均匀覆盖孔底部。在饱和湿度的培养箱 37℃孵育 2h。在凝胶凝结的过程中避免移动凝胶和培养板。

   最终胶原膜的厚度决定于胶原溶液的浓度。1.5ml 的 300μg /ml 的胶原溶液加入 35mm 培养皿并干燥后形成 1.5～2μm 厚的胶膜。较高的浓度产生较厚的胶膜。用上述方法制备大鼠尾腱胶原（见支持方案 1）正常形成凝胶的最低浓度是 100μg /ml 左右，但是对于商业化Ⅰ型胶原这个值要高一些（500μg /ml）。凝胶溶液需均匀且无气泡。

3. 将培养板移出孵箱，打开盖，置于层流柜中室温条件下气流吹过夜（此过程中凝胶彻底干成一个薄膜），室温或37℃用蒸馏水洗3次，每次30min，以除去所有在干燥过程中形成的盐的结晶（用相差显微镜检查洗涤的效率）。在层流柜中再次干燥过夜，检查没有残留的盐的结晶。
4. 加入2ml CMF-PBS或补充了青霉素/链霉素的DMEM，用密闭塑料袋包裹防止蒸发，在37℃培养箱或4℃冷藏箱储存最多2周。
5. 接种细胞之前，从孔中吸走培养液，用2ml蒸馏水洗30min，弃去水，让培养板在层流通风柜中晾干。
6. 胰酶消化并计数细胞（单元1.1），将细胞悬液用DMEM/10% FBS或适于研究用细胞系的培养液稀释至适当的浓度。

   按25μl中有10 000～50 000个细胞的浓度接种可获得最好结果，根据细胞的大小，所用细胞悬液的浓度为4×10^5～2×10^6个/ml，以在一小的中央区域形成连续的细胞单层。

7. 向每孔的中央加入25μl的细胞悬液，不要碰到脆弱的胶原膜，将培养板各孔之间加入蒸馏水以防止在接种和贴壁过程中的蒸发。将培养板放入塑料盒中，其下垫有湿纸巾以防止蒸发，放入培养箱中37℃孵育5h或过夜使细胞贴壁。
8. 每孔中加入2ml DMEM/10%FBS或其他适当的培养液，37℃孵育过夜使细胞铺展开。
9. 如果试验需要在无血清条件下进行，反复彻底地用CMF-PBS或DMEM在37℃洗10min，以除去残余的血清。
10. 此时向培养液中加入细胞因子如IL-1β（10^{-9} mol/L）、TNF-α（10^{-8} mol/L）、TGF-α（10^{-8}mol/L）或TPA（1×10^{-7}～2×10^{-7}mol/L），诱导细胞表达MMP。按试验设计将培养板在孵育1～4天（或最多7天）后，用相差显微镜观察进展。
11. 为了观察到细胞层下的膜的溶解，通过以下方法移去细胞：置细胞于1% Triton X-100，或0.5%胰蛋白酶/0.53mM EDTA（37℃ 10min），或同时使用这两种方法。用蒸馏水漂洗培养孔。
12. 用考马斯蓝染料染色5～15min显示残存的胶原膜，用蒸馏水洗3次，在蒸馏水中脱色30min（或用水快速洗3次），晾干培养板。
13. 确定底物溶解的速度与程度。

    培养板中显示出胶原的量和曝光时间（用曝光表测量）呈严格的线性关系，至少达到本方案使用的胶原层厚度的3倍。

    另外还可测量释放的放射性标记或荧光标记的胶原链和多肽。

支持方案　制备大鼠尾腱Ⅰ型胶原

注意：所有使用活动物的方案必须经研究院关怀与使用委员会审阅和批准，必须遵照政府关于饲养和使用实验动物的条例。

材料

约 400g 重大鼠的尾巴（新鲜采集并保存于－80℃）
0.5mol/L NaCl 溶于 50mmol/L Tris-HCl，pH7.4（见 Tris 的配方）
5mmol/L、50mmol/L 及 0.5mol/L 乙酸
NaCl（固体）
0.02mol/L Na_2HPO_4
13mmol/L HCl
中和缓冲液（0.2mol/L NaP_i）
玻璃毛或粗棉布
500ml 离心瓶
高速离心机（Sorvall，带 SS-34 和 GSA 转头或与之相当的离心机和转头）
10 000～14 000 MWCO 透析膜
一个大的（25L）或几个小的（4L）透析缸
灭菌剪刀
125ml 玻璃 Wheaton 瓶

1. 将 10～20 个大鼠尾去皮置于冰上，在关节处破开尾巴，拽出一根一根的胶原纤维。用大量的蒸馏水洗（20～30L）1h，不断摇动，换水 3 或 4 次。
2. 在 2L 的 0.5mol/L NaCl/50mmol/L Tris-HCl，pH7.4 中于 4℃不断摇动抽提过夜，弃去抽提物后重新进行抽提，弃去第二次的盐抽提物用蒸馏水彻底冲洗胶原纤维（至少 3h，每小时换液 2 或 3 次），用 2L 0.5mol/L 乙酸于 4℃抽提过夜同时慢慢摇动。
3. 用玻璃毛或粗棉布过滤以除去不溶性残渣，用 500ml 离心瓶，在 4℃以 11 000*g* 离心 30min，一点一点加入固体氯化钠至终浓度为 5％（50g/L），持续剧烈搅动。盐全部溶解后关闭搅动器和烧杯的盖子，放入冷室过夜，使沉淀汇集于容器底部。
4. 在 11 000 *g* 离心 30min 收集沉淀，弃上清，在原来的离心瓶中加入 450ml 0.5mol/L 乙酸，使沉淀重新溶解，将溶液转移到第二个瓶中，依此类推直到胶原全部溶解或分散于 900～1000ml 0.5mol/L 乙酸。4℃剧烈搅动过夜直至胶原彻底溶解。
5. 每次 300～400ml 将胶原溶液装入透析袋中，用 25L 0.5mol/L 乙酸透析，然后用 50mmol/L 乙酸透析 3～4 天，每天更换透析液，混合袋中溶液。
6. 在接下来的 72h 内用 0.02mol/L Na_2HPO_4 在 25L 的透析缸中透析，多更换几次透析液。
7. 用 500ml 离心瓶，在 11 000 *g* 离心 30min 收集沉淀，0.5mol/L 乙酸 40℃使胶原重新溶解，4℃剧烈搅动过夜。
8. 用 0.5mol/L 乙酸透析 3～4h，然后用 50mmol/L 乙酸透析过夜，最后用 5mmol/L 的乙酸透析过夜，更换几次透析液。
9. 4℃ 11 000 *g* 离心 1h，冻干上清，上清应无盐，存放于 4℃、－20℃或－80℃的干燥器中。

10. 按下述步骤重溶：
   a. 称取不超过 150mg 的胶原。
   b. 用灭菌的剪子剪成 1cm 的片。
   c. 将胶原放入 125ml 带有搅拌棒的灭菌的玻璃 Wheaton 瓶中。
   d. 加入冷的 13mmol/L HCl 制成 3mg/ml 的溶液，4℃快速搅动并不时的摇动约 24h。
11. 于 4℃ 50 000 *g* 离心 20min，除去任何不溶物，必要的话可在 4℃保存几个月。

基本方案 2　白明胶/干酪素酶水解图谱分析

酶水解图谱分析的方法是根据 MMP 的一些独特的特性而设计用于分析潜在的和有活性的 MMP 的蛋白水解能力：①只要不加热和使用还原剂在含有 SDS 的缓冲系统电泳后，MMP 仍然具有（或重新折叠以显示）催化活性；②短时间曝露于 SDS 打开了胱氨酸开关，所有的前体以及蛋白水解后截短的（活化的）酶都显示催化活性；③MMP 的催化活性能被 SDS 可逆地抑制，用 Triton X-100 漂洗除去 SDS 后，酶恢复了活性。白明胶适用于 MMP-2 和 MMP-9，而 MMP-1、MMP-3、MMP-7、MMP-8 和 MMP-10 更适合使用含有干酪素的凝胶。

注意：下面的操作方法是基于标准的 10% SDS-PAGE，它根据 Laemmli（Laemmli 1970；单元 7.1）的带有 4%积层胶（stacking gel）和 pH8.3 电泳缓冲液的文献，很重要的一点是在样品制备和电泳时避免加热或使用还原剂。

材料（带√项见附录 1）

白明胶（牛皮肤，Sigma-Aldrich B6-6269 型）或干酪素（Sigma-Aldrich，tehnical，C-0376）
√2.0mol/L Tris·Cl，pH8.8
√30/0.8 丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺
甘油
√10%（w/v）SDS
TEMED
10%（w/v）过硫酸铵
待研究的 MMP 制备物（用 1～5ng 纯化的 MMP 作为标准）
√5×电泳样品缓冲液
√电泳缓冲液
√凝胶漂洗缓冲液 1～4
√考马斯蓝染料
√凝胶脱色液
50ml 离心管
57℃水浴
Whatman no. ＃1 滤纸或 0.5μm 针头滤器

适当大小的凝胶漂洗盘

1. 称适量的白明胶（终浓度 0.1～1.0mg/ml）或干酪素（终浓度 1.0mg/ml），放入 50ml 离心管。每制备 10ml 的溶液加 4ml 2.0mol/L Tris·Cl，pH8.8 和 6ml 水，57℃水浴溶解。用 Whatman no. ＃1 滤纸或 0.5μm 针头滤器过滤。
2. 将下列物质加入到 10ml 过滤好的白明胶或干酪素溶液（0.2～1.3mg/ml，溶于 0.8mol/L Tris·Cl，pH8.8），以制备 10％分离胶：
   6.6ml 30/0.8 丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺
   2g 甘油
   0.2ml 10％（w/v）SDS
   13.3μl TEMED
   67μl 10％（w/v）过硫酸铵
   倒胶方法描述在单元 7.1
3. 混合下列物质制备 4％积层胶：
   1ml 30/0.8 丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺
   0.36ml 2mol/L Tris·Cl，pH6.8
   75μl 10％（w/v）SDS
   6ml H_2O
   8μl TEMED
   60μl 过硫酸铵
   倒胶方法描述在单元 7.1
4. 将 1 份 MMP 溶液（部分或全部纯化的 MMP、培养液、浓缩的培养液或其他含有 MMP 的制备物）与 4 份 5×电泳样品缓冲液（终浓度，1％SDS）混合。室温孵育 10min，15ml 的凝胶每孔加入 20μl～30μl 样品。
5. 用 pH8.3 的电泳缓冲液，200V 电泳 30～45min，或直到染料前沿到达凝胶的底部。
6. 从电泳槽中取出胶放入适当大小的容器中，按漂洗缓冲液 1、2、3、4 的顺序洗 4 次，每次 20min，最后一次漂洗后换上新鲜的漂洗缓冲液 4，37℃孵育 1～24h。
7. 用考马斯蓝染料染色 30min，用凝胶脱色缓冲液脱色数小时至带型清晰可见。

基本方案 3　反向酶水解图谱分析

反向酶水解图谱分析专门设计用于分析显示出抑制 MMP 活性的电泳带。

材料（带√项见附录 1）

√8.7mg/ml 白明胶溶液
　MMP-2（白明胶酶 A）
√5×电泳样品缓冲液
　2.5％（w/v）Triton X-100
√孵育溶液

1. 制备17%的分离胶，用白明胶（2.5mg/ml）和纯化的白明胶酶A（MMP-2）共同聚合，混合下列组分（也可见单元7.1）：
   4.2ml 8.7mg/ml 白明胶溶液
   0.16μg/ml（终浓度）白明胶酶A（MMP-2）
   8.25ml 30/0.8 丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺
   2.1ml H_2O
   0.29ml 10%（w/v）SDS
   7.3μl TEMED
   73μl 10%（w/v）过硫酸铵
2. 混合下列物质制备5%积层胶：
   1.66ml 30/0.8 丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺
   1.55ml 2mol/L Tris·Cl，pH6.8
   125μl 10%（w/v）SDS
   8.2ml H_2O
   10μl TEMED
   200μl 过硫酸铵
   按单元7.1中的方法灌胶
3. 将样品与反向酶水解图谱分析的5×样品缓冲液混合，室温孵育10min以上，凝胶每个加样孔加20～30μl，150V电泳至缓冲液前沿到达凝胶底部。
4. 取出凝胶用2.5% Triton X-100洗3次，轻轻摇动，共洗约2h。
5. 37℃在孵育溶液中孵育过夜。
6. 用考马斯蓝染料染色20min，用凝胶脱色溶液脱色数小时至背景清晰。

参考文献：Birkedal-Hansen，1987；Lin et al.，1987；Van Wart and Birkedal-Hansen，1990

撰稿人：Henning Birkedal-Hansen，Susan Yamada，Jack Windsor，Anne Havemose Poulsen，Guy Lyons，William Steter-Stevenson，and Bente Birkedal-Hansen

（陈　澄 译　陈誉华 校）

第 14 章　细胞的能动性

真核细胞运动和对周围环境作出反应的能力是细胞形态发生的关键，也是肿瘤细胞侵袭的基础。大多数细胞具有向化学吸引剂迁移的能力。在趋化运动方面，细胞须能辨认化学梯度的方向，使自己朝向化学梯度做定向运动。调节细胞趋化运动的过程较复杂，包括伸出伪足、附着于底物和解除原有附着等。本章将叙述分析这些过程的方法。

单元 14.1 叙述研究细胞沿化学梯度定向运动的基本实验方法。单元 14.2 叙述评价细胞经基膜基质侵袭的实验步骤。单元 14.3 叙述观察迁移细胞沿底物运动时产生牵拉力的实验步骤。单元 14.4 叙述研究细胞损伤和修复过程的方法，这些方法基于受伤细胞可摄取示踪大分子物质的研究发现。正常情况下，示踪大分子物质不能进入细胞内。细胞修复时，细胞内含有示踪物质。最适合用于研究细胞动力学的细胞是盘基网柄菌属阿米巴虫，这类细胞以分散形式生长，但饥饿时很快聚集成簇，形成多细胞结构。在聚集成簇过程中，阿米巴表现趋化运动、信号转导、细胞膜波动、吞噬和分裂等一系列不同行为。单元 14.5 叙述如何使盘基网柄菌属阿米巴虫成像，以便研究野生型细胞和基因修饰细胞系的能动性和趋化性行为。

撰稿人：Jennifer Lippincott-Schwartz

单元 14.1　真核细胞趋化实验

趋化是指细胞沿化学梯度定向运动的倾向，有助于细胞做变形运动和在炎症部位聚集。

策略设计

细胞根据趋化受体与化学吸引剂结合的变化探测化学吸引剂浓度的变化。化学梯度最陡和吸引剂浓度稍低于与受体结合呈饱和状态时，趋化剂与受体结合的变化最大。化学梯度按一定坡度呈直线形上升（如趋化剂浓度升高 10 倍，坡度超过 1 mm）时，稍低于受体 K_d的化学吸引剂浓度（该浓度使 1/2 受体被结合），引起的细胞趋化较理想。因为化学梯度的几何曲线在不同实验是不同的，所以在合适浓度范围内需要达到较陡梯度的浓度也不同。在细胞迁移的整个过程中，梯度取决于合适浓度和梯度坡度。

恰当的实验体系选择受下列 4 个因素影响：①被研究细胞的运动速率；②实验目的（鉴定一种因子是否具有趋化性或评价趋化机制）；③完成实验的恰当时间；④细胞和化学吸引剂的可靠性（实验取决于细胞数目和化学吸引剂总量，表 14.1.1）。另外，实验也取决于时间保证和实验提供的信息（表 14.1.1 和表 14.1.2）。

表 14.1.1 趋化实验的要求

实验类型	细胞数（每个器皿）	化学吸引剂		重复实验
		浓度/$\times K_b$	最小容量/μl	同批检测器皿数
多孔滤膜	10^4～10^5	0.1～10	25[a]	12～48 个孔
培养嵌套	0.5×10^6～5×10^6	0.1～10	10	24 个嵌套
琼脂糖孔	10^5	10～1000	10	10～20 个孔
少量细胞	10^3	0.1～10	0.3[b]	约 8 个皿
有桥培养池	10^3	0.1～10	50[a]	5 个装置
吸管	1～50	10^3～10^4	5	1 支

a. 为 48 孔培养皿和有桥培养皿的容量，其他复室培养皿和 Plexiglas 桥式培养皿需要较大剂量。

b. 每次用 0.1 μl，连续 3 次。

表 14.1.2 根据要求选择合适的趋化实验

细胞类型	检测趋化反应的实验	研究趋化反应机制的实验
白细胞	滤膜、琼脂糖孔	琼脂糖孔、有桥培养皿、吸管、上移
网柄菌	少量细胞实验、吸管、聚集实验[a]	有桥培养皿、吸管、上移
MTLn3/成纤维细胞	滤膜	滤膜、吸管、上移

a. 正常的网柄菌聚集部分地由趋化介导，该实验步骤详见 Soll（1987）的论文。

基本方案 1　滤膜趋化实验

实验前需适当选择：①细胞培养皿（如 Neuro Probe 公司生产的盲孔培养皿或多孔培养皿，也可选用带有滤膜嵌套的 24 孔培养板）；②滤膜（较厚的纤维素硝酸盐或较薄的聚碳酸盐）；③滤膜孔径大小；④滤膜表面包被（根据实验细胞类型）。通过下列检测使细胞迁移定量：①细胞迁移入滤膜的距离；②贴于滤膜底面的细胞数；③穿经滤膜和掉入下池的细胞数。如果一种因子引起细胞迁移增强，需进行其他实验以确定是否由随机迁移（化学促进作用）或向试剂定向运动（趋化作用），或两种协同作用引起的。将待测物注入滤膜的上方和下方，按一系列均一（各向同性的）浓度检测细胞迁移，以此可观察化学促进作用。

材料（带√项见附录 1）

缓冲液，用于上孔和下孔

化学吸引剂，用缓冲液配制

目的细胞

3.7%（w/v）甲醛，用 PBS 配制（见配制方法）

√Giemsa 染料和 Diff-Quick（EM Science），用于中性粒细胞；苏木素，用于淋巴细胞

70%和 100%异丙醇

1∶1（v/v）异丙醇/Americlear

Americlear（Baxter Biotech）

Permount（EM Science）

15μm 聚苯乙烯微珠（Polysciences）

细胞趋化皿：有合适滤膜的盲孔培养皿或复室培养皿（Neuro Probe），或有滤膜嵌套的24孔培养板

滤膜刮器（Neuro Probe 的产品较理想）

装有40×物镜和测微尺（装于16×物镜上较理想）的显微镜

1. 用缓冲液或化学吸引剂缓冲液注满细胞趋化皿下孔，注入的液体要稍高出下孔，以免放入滤膜时膜下出现气泡（表14.1.3）。

   上室不含化学吸引剂时，理想的下孔内化学吸引剂浓度应接近于受体离解常数 K_d。

表 14.1.3 细胞趋化皿的特征

细胞趋化皿	下孔容量/μl[b]	滤膜表面积	上孔容量/μl	细胞数
盲孔培养皿[a]	200	18 mm^2	200	50 000
12孔复室培养皿[a]	150[b]	18 mm^2	100	48 000
48孔复室培养皿[a]	25	3.2 mm^2	50	15 000
24孔组织培养皿	600	0.3 cm^2	100	1 000 000

a. 可从 Neuro Probe 公司购买。

b. 最好多注入一点液体，以免产生气泡。

2. 将滤膜慢慢放入培养皿，检查是否上、下孔内的液体与滤膜充分接触，即是否有气泡。然后，组装培养皿的其他部件，并将螺丝钉拧紧。

   使用多孔培养皿时，应将滤膜预先浸泡，以免滤膜吸取上、下孔内的液体。放入滤膜后不要移动滤膜，使上、下孔内的化学吸引剂浓度不至于受影响。

3. 注满培养皿后，将一定数目的细胞均匀注入上孔的缓冲液中（表14.1.3），再将培养皿放于湿润和37℃的条件下，孵育细胞。

   孵育时间的长短取决于细胞种类、滤膜和实验指标（见表14.1.4）。

表 14.1.4 滤膜趋化实验的孵育时间和染色步骤

细胞种类	滤膜类型	膜孔直径/μm	孵育时间	染色步骤
中性粒细胞	厚	3.0	迁移入滤膜需0.5～2.0 h，穿过滤膜需3～4h	甲醛固定，新鲜 Giemsa 液染色1 h或过夜
中性粒细胞	薄	3.0	20 min	甲醛固定，风干，Diff-Quick 染色
淋巴细胞	薄	3.0～5.0	4h	苏木素染色，过夜
成纤维细胞	薄	8.0	3～4h	苏木素染色1 h或过夜

4. 用吸管吸去上孔内的液体。然后卸开培养皿，轻轻取出滤膜。立即将培养皿放入水中浸泡。如果使用薄滤膜，用滤膜刮器刮除滤膜上面的细胞。
5. 将滤膜放入盛有10 ml 3.7%甲醛溶液的小 Coplin 瓶内，在室温条件下固定30 min或过夜，然后在室温条件下染滤膜上的细胞≥1h（见表14.1.4）。应将滤膜彼此分开，以便使染液容易渗入每片滤膜。
6. 按下列步骤使滤膜脱色和清洗滤膜，每次温育5 min：用水2次，70%异丙醇1次，

100%异丙醇 2 次，异丙醇和 Americlear（1∶1）混合液 1 次，Americlear 3 次。用 Permount 温育滤膜 30min，然后将滤膜封固于载玻片上。

7a. 记录细胞迁入厚滤膜内的距离：在 40×物镜下，用显微镜微聚焦旋钮调节测微尺，测量滤膜上面至最远的两个细胞（在同一聚焦平面）的距离，也可用其他便利方法测量。每个滤膜重复测量 5 个视野。

7b. 记录薄滤膜下面的细胞数目：用 16×或 40×目镜计数滤膜下面每个视野内的细胞数目。至少重复计数 5 个视野。

7c. 计数从下孔收集到的细胞：收集下孔内的液体，用吸管取收集的液体反复冲洗，以洗下贴于下孔壁的细胞。用血细胞计数板或细胞分选器计数细胞悬液中的细胞。为了通过分选计数细胞，将一半细胞悬液与一定量的聚苯乙烯微珠（直径为 15 μm）混合。使细胞悬液流经细胞分选器，绘制前散射和侧散射的图。得出微珠与细胞的比率，从而算出细胞悬液中的细胞数目。

8. 如果观察到下孔内某一特定浓度的液体促进细胞迁移，应测定这种浓度的液体对于细胞迁移至滤膜上、下方的作用（细胞的迁移率和迁移数）。另外，需测定该浓度 1/2、1/4、1/8 的液体的作用。

也可应用简单的化学促进作用和趋化作用数学分析方法（见支持方案 1）。

支持方案 1　计算无化学吸引剂时细胞迁入厚滤膜的大约距离

此计算方法可用于粗略估计未受刺激的迁移和化学促进作用对于细胞迁入厚滤膜的影响（见基本方案 1）。此外，也有更精确的方法。超过计算值的迁移可看作为趋化反应。非趋化迁移的计算基于下列估计：①滤膜上、下的浓度梯度呈直线形；②细胞在两种已知速度之间的稳定加速运动；③距离最远的两个细胞的运动与单一颗粒的移动（刺激物浓度的作用）相等。

对于这种简单计算，是在 10%和 50%血清经 130 μm 厚的滤膜形成浓度梯度的条件下来观察细胞迁移的。为了检测非趋化迁移，以 10%、30%和 50%这 3 种浓度（滤膜上、下面的浓度相同）测定迁移速度。浓度梯度实验和同浓度实验的时间（30 min 或一个时间单位）是相同的。计算时应用下列实验指标和结果：①一定浓度（滤膜上、下方）条件下的迁移速度（V）是指一个时间单位孵育后由滤膜上面至迁移最远的两个细胞之间的距离。例如，迁移速度为 $V_0=84\mu m$/单位时间（10%血清）、$V_1=73\mu m$/单位时间（30%血清）、$V_2=60\ \mu m$/单位时间（50%血清）。②第一种浓度（由浓度确定速度）条件下细胞迁离滤膜上面的距离为 d_1，第一种浓度至第二种浓度的迁移距离为 d_2，以此类推。由于此例计算 3 种均匀分布的浓度（呈直线形梯度）条件下的迁移速度，d_1 是滤膜上面（10%血清）至中部（30%血清）的距离，d_2 是滤膜中部（30%血清）至下面（50%血清）的距离。因此，$d_1=d_2=65\mu m$。

由于加速运动是不变的，距离 d_1 的平均速度为 $Vbar_1=(V_0+V_1)/2=78.5\mu m$/单位时间。由此，自滤膜上面迁移至中部（$d_1$）所需时间为：$T_1=(d_1)/(Vbar_1)=0.828$（单位时间）。同样，距离 d_2 的平均速度为：$Vbar_2=(V_1+V_2)/2=66.5\mu m$/单位时间。自滤膜中部迁移至下面（$d_2$）的时间为：$T_2=(d_2)/(Vbar_2)=0.977$（单位时间）。

因 T_2和 T_1之和大于 1 个单位时间，最远的两个细胞在一个时间单位的迁移距离小于 d_1和 d_2之和。为了计算细胞在单位时间内的迁移距离达 d_2，可应用 d_2的加速度运动，即 $a_2=(V_2-V_1)/T_2=-13.3\ \mu m$（单位时间）^{2}。细胞经过 d_1后的剩余时间（即细胞经过 d_2的时间）为：$T_f=1-T_1=0.172$（单位时间）。细胞迁移入 d_2的距离为：

$$V_1(T_f)+\frac{a_2(T_f)^2}{2}$$

由此，最远细胞的总迁移距离约为：

$$d_t=d_1+V_1(T_f)+\frac{a_2(T_f)^2}{2}$$

$$d_t=65\mu m+73\mu m(\text{单位时间})+\frac{[-13.3\mu m/(\text{单位时间})^2]\times 0.172\ (\text{单位时间})^2}{2}=77\mu m$$

为了用处于 10%～50%血清的浓度梯度条件下的细胞测定趋化作用，需将测量的细胞沿浓度梯度迁移的距离与上述计算值比较。迁移距离大于 77 μm 提示为趋化作用。

基本方案 2 琼脂糖下趋化实验

注意： 除特殊情况，应在 37℃和 5% CO_2的条件下进行细胞培养。一些培养基（如 DMEM）需改变 CO_2 水平，使 pH 维持在 7.4。

材料（带√项见附录 1）

√琼脂糖板混合物
√迁移培养液
细胞悬液（10^7个/ml），用迁移培养液配制
化学吸引剂溶液，用迁移培养液配制
纯甲醇
37%（w/v）甲醛
0.5% Fields 染液 B（w/v，Gallard-Schlesinger）
2.5% Fields 染液 A（w/v，Gallard-Schlesinger）
直径 35 mm 培养皿
3mm 无菌打孔器(不锈钢打孔器或塑料吸管尖部),配有一根抽真空管和一个接收烧瓶
用于打孔的模板，孔以单列排列，孔径为 3 mm，各孔间隔 2 mm
计数网格（可选用）

1. 将 3 ml 琼脂糖板混合物加入直径为 35 mm 的培养皿内，在室温条件下让其冷却和变硬。然后，将盛有琼脂糖板的培养皿放入培养箱，在 37℃和 5% CO_2（v/v）条件下预处理数小时或过夜。
2. 将 3 mm 无菌打孔器与抽真空管及接收烧杯相连。用模板制作 5 个孔径为 3 mm 的小孔，各孔排列在一条直线上，相互间隔 2 mm。将打孔器插入琼脂糖层直至塑料板，

然后通过真空作用将琼脂糖块取出。

3. 按不同浓度（逐渐增高），用迁移培养液混悬化学吸引剂。然后，用迁移培养液混悬细胞（10^7个/ml）。

   为了形成有效的浓度梯度，化学吸引剂的浓度应是趋化受体 K_d（表 14.1.1）的约 10～1000 倍。

4. 实验时，首先向最外侧的两个孔内注入 10 μl 迁移培养液，其次向相邻的孔内注入 10 μl 细胞悬液，最后向中央的孔内注入 10 μl 化学吸引剂。然后，将琼脂糖板放回培养箱，在 37℃和 5% CO_2条件下培养 2 h（中性粒细胞）或更长时间（其他种类的细胞）。
5. 向盛有琼脂糖板的培养皿内注入 1 ml 纯甲醇，在室温条件下固定细胞 30 min 或在 4℃条件下过夜。然后吸去甲醇，加入 1 ml 37%甲醛，在室温条件下固定细胞 30 min（冷条件下延长固定时间）。
6. 取出琼脂糖板，必要时用 Pasteur 吸管将琼脂糖板的边缘撬起。
7. 加入 1 ml 0.5% Fields 染液 B，随即加入 1ml 2.5% Fields 染液 A，染色 1～2 min。然后，用自来水浸洗琼脂糖板，再让其干燥。

8a. 测量最大迁移距离：沿 5 个孔中央的连线，测量细胞孔的边缘至迁移细胞最前缘的距离。比较细胞迁向化学吸引孔的距离和细胞迁向培养液孔（最外侧的孔）的距离。

8b. 计数迁移细胞：用方格测微仪计数自细胞孔迁移不同距离的细胞。

9. 计算化学吸引系数和趋化系数。

   因大多数化学吸引剂呈剂量依赖性刺激细胞运动，故需仔细分析，鉴别化学吸引剂刺激引起的运动（化学促进作用）和定向运动（趋化作用）。解决方法是，通过观察同一部位化学吸引剂（掺入琼脂糖）在不同浓度情况下对于细胞迁移的作用，检测化学吸引剂刺激引起的运动。根据测量数据可计算化学促进系数，而化学促进系数可用于评价化学促进和趋化作用对于细胞以化学吸引梯度形式迁移的相对作用。

   通过用录像显微镜观察细胞迁移，可观察到单细胞的朝向和定向迁移。对于已固定细胞，有研究者以细胞核是否朝向确定细胞是否朝向化学吸引源。

基本方案 3　少量细胞趋化实验

材料（带√项见附录 1）

纯琼脂（如 Noble 琼脂，Difco）

√Bonner 盐

网柄细胞（处于对数生长期），浓度≤5×10^6个/ml

√17 mmol/L Sorensen 磷酸缓冲液，pH 为 6.2

化学吸引剂溶液，用 Sorensen 磷酸缓冲液配制

直径 10 cm Petri 皿

1. 用 Bonner 盐配制 0.5%～1%纯琼脂（w/v）。将 10 ml 琼脂盐溶液注入直径10cm Petri 皿内，让琼脂变硬。在室温条件下，将琼脂板放置 1 天，随后在 4℃条件下储存，可至 1 周。

2. 用17 mmol/L Sorensen磷酸缓冲液（用冰预冷，pH为6.2）洗网柄细胞两次，然后混悬细胞，密度为10^7个/ml。在21～23℃条件下，振荡1 h（检测对叶酸盐的反应）或6～8 h（检测对环腺苷酸的反应）。
3. 洗细胞1次，用17 mmol/L Sorensen磷酸缓冲液混悬细胞，密度为10^7个/ml。将0.1μl细胞悬液（10^3个细胞）按一定间隔滴于琼脂上面。
4. 远离细胞悬液滴约100μm，滴加0.1μl化学吸引剂溶液。每隔5min重复1次，共滴加3次。在21～23℃条件下，孵育约30min。每隔10 min检查琼脂板。

   化学吸引剂的浓度应在K_b的1/10至100倍之间选择（表14.1.1）。
5. 检查每滴细胞悬液处细胞的分布，确定是否有较多的细胞向液滴边缘（邻近化学吸引剂液滴）聚集。通过计算发生反应的细胞悬液滴的百分比对反应定量，100%为强反应。

基本方案4　桥趋化实验

材料（带√项见附录1）

细胞：全血、悬浮状态的中性粒细胞或盘基网柄菌

0.9%氯化钠（w/v）

HEPES缓冲的HBSS，含有0.2% BSA（w/v，用于悬浮状态的中性粒细胞）按HBSS配制方法（见方法）制备，但用10 mmol/L HEPES酸取代碳酸氢钠

√17 mmol/L Sorensen磷酸缓冲液（pH为6.2，用于网柄菌）

化学吸引剂，用HEPES缓冲的HBSS和1%明胶（w/v）配制

HEPES缓冲的HBSS和1%明胶（w/v）配制的液体

20 mm×40mm盖玻片，用于中性粒细胞时不需要酸洗，用于网柄菌时需要酸洗（见方法）

玻片（Neuro Probe）或Plexiglas有桥培养池（图14.1.1）

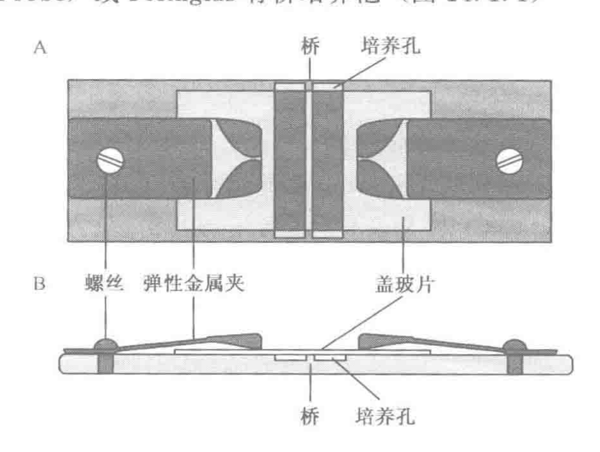


图14.1.1　用于桥趋化实验的装置

（A）上面观；（B）侧面观

有机玻璃或玻片（厚3 mm，宽2.5 cm）有两个皿（宽4～5 mm，深1 mm），被桥（宽1 mm）隔开。将20mm×40mm盖玻片盖在皿上，然后用两个有弹性的金属夹固定，使盖玻片和桥之间出现窄隙（如5 μm）。在桥处，盖玻片下面的细胞变扁平。可观察细胞向另一个皿迁移的方向

装有40倍物镜的显微镜

1a. 全血内中性粒细胞的实验：将约0.1 ml人血（如经穿刺手指取的血液）过中央放于20mm×40 mm盖玻片上，然后将盖玻片放入湿润的37℃培养皿（如含有一片湿滤纸的Petri皿）。是否用5%～10% CO_2取决于孵育液是否是碳酸氢钠缓冲体系。孵育约45 min，至血液凝固并开始收缩，在凝血块周缘处出现液体。用0.9%氯化钠轻轻浸洗去凝血块和红细胞。不要使剩余细胞干燥。

1b. 悬浮状态的中性粒细胞的实验：用HEPES缓冲的HBSS（含有0.2% BSA）配制人或兔中性粒细胞悬液（3×10^5个/ml）。将0.1 ml细胞悬液以条带状（约200 mm^2）过中央放于20mm×40 mm盖玻片上，在室温条件下放置约5 min。将盖玻片放入有桥培养池前，用几滴孵育液浸洗细胞。

1c. 网柄菌实验：用17 mmol/L Sorensen磷酸缓冲液（pH为6.2）配备网柄菌悬液（5×10^4个/ml）。将50 μl细胞悬液以细条带状过中央放于20mm×40 mm盖玻片（用酸洗过）上，在室温条件下静置5～10 min，使细胞贴壁。

2. 倾斜盖玻片，使液体流向Kimwipe纸巾，以便尽快除去细胞上面的液体。
3. 在干净培养池内翻转盖玻片，以便使细胞位于桥上方。然后，将盖玻片慢慢放下，使一侧边缘先接触下方的玻片。在两侧分别固定金属夹，不要移动盖玻片。
4. 借助于毛细管作用，用约0.1 ml HEPES缓冲的HBSS或化学吸引剂注满两孔。两种液体含有1%明胶。在37℃（网柄菌实验在室温下进行）条件下，孵育细胞10～20 min，使细胞产生迁移反应。
5. 用40倍物镜观察在桥正中处的细胞。根据形态学标准，确认100个细胞的迁移方向。用朝向化学吸引剂细胞的百分数和化学吸引剂浓度制图。

   运动细胞的头部有一较宽的板状伪足，而尾部较细，呈节状，或被收缩纤维拖掉。

基本方案5　吸管趋化实验

材料

化学吸引剂溶液，用实验缓冲液配制

实验缓冲液：为17 mmol/L Sorensen磷酸缓冲液（pH为6.2，见方法），含或不含（网柄菌实验）$CaCl_2$和$MgCl_2$。也可用DPBS（见方法，JRH Biosciences产品，用于MTLn3细胞）

目的细胞

Omega点滴管（4 in毛细玻璃管，外径1 mm，内径0.58 mm，A-M Stevens）。

用于微注射和神经生物学的移液管拉制器，可制作尖端直径约0.1 μm的移液管（如David Kopf Instruments，Narishige，Sutter Instruments）

注射器，装有细针（如3 in、30 G的针）

微操纵器，可装于显微镜载物台（如Leitz，Narishige）

1. 取Omega点滴管，用移液管拉制器制作移液管（尖端直径约0.1 μm）。

2. 将移液管尖端朝下，从上方加入 1 滴化学吸引剂溶液，使移液管尖端注入液体。然后，用装有细针的注射器从下方注满移液管尖端。

对于昂贵的趋化蛋白，用微量进样器（Eppendorf）直接注入移液管尖端。移液管内需有高浓度的化学吸引剂（受体 K_d 的 10^3～10^4 倍，表 14.1.1）。

3. 将细胞放入 Petri 皿，然后加入一薄层实验缓冲液。
4. 将微移液管置于微操纵器内，使移液管尖远离培养皿表面 2～5 μm。必要时，使用正压以提高注射速率。根据细胞种类，培养合适的时间。
5. 通过测下列数据评价细胞反应：①向移液管运动的细胞百分数；②反方向（细胞运动方向与移液管方向夹角的余弦）的精确度；③细胞向移液管运动的速度。

参考文献：Baggiolini，1988；Boyden，1962；Buettner et al.，1989；Lauffenburger et al.，1983

撰稿人：Sally H. Zigmond，Ellen F. Foxman，and Jeffrey E. Segall

单元 14.2 侵袭实验

基膜是位于上皮细胞和内皮细胞下面的一层较薄的细胞外基质。肿瘤细胞须经血管基底膜穿入深面间质，才能侵袭组织和转移至远处。

基本方案 测量经基质的侵袭

注意：除特殊情况，应在 37℃和 5% CO_2 的条件下进行细胞培养。一些培养液（如 DMEM），需调节 CO_2 水平，将 pH 维持在 7.4。

材料（带√项见附录 1）

√3T3 条件培养液、选用的化学吸引剂或抑制剂
培养状态的肿瘤细胞，分开培养后 24 h 接近形成单层
√0.5mol/L EDTA，pH 为 8.0
培养液，含有 0.1% BSA（w/v，依细胞种类而定）
Diff-Quik 固定液和染色液（Baxter）
Boyden 培养池（Neuro Probe，单个或 48 孔，见图 14.2.1）
不含聚烯吡酮（PVP）的聚碳酸盐膜，孔径为 8 μm 或 12μm（如 Nucleopore 滤膜，Neuro Prob）。滤膜大小应适合放于涂布 Matrigel（见支持方案）的 Boyden 培养池，单个培养池的滤膜直径为 13 mm，48 孔培养池的滤膜为 25mm×80 mm。

1. 将 3T3 条件培养液或其他化学吸引剂加入 Boyden 培养池下室，直至液面呈现半月形隆起。

每次实验的数据一般以 3 批滤膜或孔为准，包括 3 个阴性对照孔（下室无迁移因子）。如果使用 48 孔培养池，每种浓度实验包括 3 个阳性孔和 3 个阴性孔（只含培养液）。

一般用纳克或微克浓度的化学吸引剂。最好检测几种不同浓度的化学吸引剂的作用。

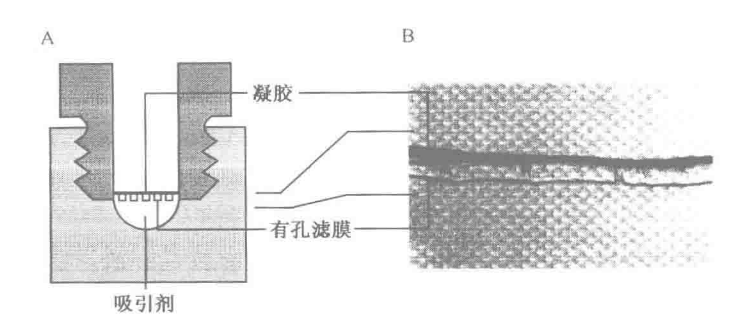


图 14.2.1　用于侵袭实验的培养皿的构形

（A）Boyden 培养皿组装示意图；（B）预涂 Matrigel 的有孔滤膜的断面显微照片。此图是经美国肿瘤研究协会允许复制而成（Albini et al. 1987）

2. 将预涂 Matrigel 的滤膜放于下孔上方，并用垫圈加固。
3. 吸出培养液，然后加入 0.5mol/L EDTA，覆盖培养皿的细胞层，从而自培养皿取出肿瘤细胞。在室温条件下，用台式离心机将细胞悬液离心（170 *g*）5 min。然后，吸去上清液，用无血清培养液混悬细胞，细胞密度为 5×10^5个/ml（用 48 孔培养皿时密度为 1×10^6个/ml）。将细胞加入培养皿的上孔（每个 0.5 ml 孔加入 100 000～200 000 个细胞，每个 0.05 ml 孔加入 50 000 个细胞）。
4. 在培养箱内（湿润、37℃和含有 5% CO_2）培养 3～6h。
5. 取出培养皿，用 Diff-Quik 固定液固定滤膜。然后取出滤膜，用固定液浸泡 10s，再分别用染液Ⅰ和染液Ⅱ染色 2 min，最后用自来水洗几秒钟。
6. 用棉签擦去滤膜上面的细胞，然后将滤膜封在载玻片上，下面朝下。计数滤膜上的细胞。

支持方案　准备涂布 Matrigel 的滤膜

用 Matrigel 预涂滤膜上面，模拟体内细胞迁移处的细胞外基质。

材料

不含 PVP 的聚碳酸盐滤膜，孔径为 8 μm 或 12μm（如 Nucleopore 滤膜，Neuro Probe）。滤膜大小应适合放于 Boyden 培养池（单个培养池的滤膜直径为 13 mm，48 孔培养池的滤膜为 25mm×80 mm）。

Matrigel（Becton Dickinson Labware 或 Sigma）。

1. 用永久墨水笔在滤膜的模糊面标记数字。

2a. 单一培养池的 Matrigel 滤膜的准备：用冷蒸馏水稀释 Matrigel，浓度为 1μg/μl。用吸管将 25μl Matrigel 注于滤膜（直径为 13 mm）模糊面的中心处，然后过夜风干。

2b. 48孔培养皿 Matrigel 滤膜的准备：用冷蒸馏水稀释 Matrigel，浓度为 0.5μg/μl。将滤膜的光亮面朝下，用1 ml Matrigel 涂布滤膜上面。孵育15～20 min 后，将滤膜挂起，风干5～10 min。为了方便风干，在滤膜一角穿一大头针或普通针，钉在木板上。在此角切口，以便于实验结束时确认滤膜的上、下面。

参考文献：Albini et al. ,1987；Liotta，1989

撰稿人：Hynda K. Kleinman and Karin Jacob

单元 14.3 细胞牵引力

细胞在迁移过程中对底物产生牵引力，这种牵引力可在整个细胞或细胞局部下面检测。

基本方案1 检测细胞在起皱底物上的牵引力

材料

目的细胞

对目的细胞专用的培养液，不含酚红，添加20～50mmol/L HEPES

二甲聚硅氧烷（60 000 或 30 000 厘泡*，Sigma）

无酚红培养液，用家用真空器除气

显微镜载物台温度控制系统（或头发吹风机和控制器）

盖玻片，用酸洗过

Petri 皿，比盖玻片稍大

配有录像系统的倒置显微镜（装有长距离工作目镜）或正置显微镜（装有多液体浸渍目镜）

显微操作仪（可作三维调节，如 Nanishige），装有持针器（World Precision Instruments）

已校准的微型针（见支持方案1）

计算机，装有合适的电视图像捕获卡和图像分析软件（如 NIH Image，可用匿名 FTP 从 zippy. nimh. nih. gov 网站下载）

Macintosh 计算机，装有 Scion 图像捕获运行器

1. 将二甲聚硅氧烷液注于干净的盖玻片上，扩展形成一薄层，厚20～50μm。将本生灯炉头的燃料气体量调至最小。然后，将盖玻片的二甲聚硅氧烷液面朝下，用镊子夹持盖玻片，使盖玻片穿过火焰上部约1.5s。

   交联时间会影响二甲聚硅氧烷片的硬度。

   本方法的典型交联只发生在二甲聚硅氧烷液的最上层（厚1 μm）。聚硅氧片自然形成许多皱褶，变得不透明。但是，聚硅氧片冷却时，在5～20s 内变得透明。

---

*厘泡，运动黏度单位。

2. 如果细胞不是在室温条件下培养，在用于测量的显微镜载物台上调整好细胞培养温度。
3. 用不含酚红且添加 20～50 mmol/L HEPES 的常用培养液接种细胞或分离原代细胞。
4. 如果细胞可以传代，用胰蛋白酶和 EDTA 混合液轻度消化细胞（单元 1.1），从而自培养器皿内取出细胞。然后，加入较多的添加 HEPES 和血清（或 BSA）的除气无酚红培养液，使胰蛋白酶失活。用同样培养液混悬细胞。
5. 将盖玻片放入 Petri 皿（稍大于盖玻片），液体面朝上。向 Petri 培养皿加入除气培养液，深度≥0.5 cm。按一定密度将细胞加于牵引实验底物上，不要使细胞互相接触，但应加入足够于测量的细胞。在室温条件下培养 1～3 h，直至细胞恢复正常形态和迁移速度。

   将细胞悬液注在二甲聚硅氧烷膜一侧，使其流向另一侧，以便迅速覆盖二甲聚硅氧烷膜。此步骤引起的膜破裂最少。

   正常的迁移速度常指在涂布一层某种细胞外基质（ECM）的载玻片上的迁移速度。
6. 将盛有细胞的 Petri 皿放于显微镜载物台（可实现温度控制）上，记录细胞对二甲聚硅氧烷膜产生的皱褶。先记录图像视野的校准尺度，然后以此校准尺度直接测量皱褶长度，或用装有图像捕获器和图像分析软件的计算机测量。
7. 将铺有底物的盖玻片（无细胞）封固于含有培养液的 Petri 皿内，再将培养皿放于装有录像系统显微镜的载物台上。然后，将带有持针器的显微操作仪安置在合适位置，以便针尖可达理想视野的中央。
8. 将已校准的微型针固定于显微操作仪内，用显微操作仪将微型针在二甲聚硅氧烷膜上向侧面移动，直至产生皱褶，这些皱褶比细胞产生的皱褶短或长。
9. 通过校准的录像记录，确定针尖产生皱褶（长度）时的移动距离。记录录像视野的校准尺度，然后按此视野尺度计算针尖产生皱褶前后的移动距离（同步骤 6）。
10. 对于每条皱褶的长度，应按针的不易移动性（见支持方案 1）和偏向计算产生皱褶的力，由此得出力-皱褶长度曲线。
11. 用步骤 10 得出的力-皱褶长度曲线计算产生皱褶（步骤 6 测量的）需要的力。

支持方案 1　校准微型针

材料

直径为 25 μm 的镍铬热电偶线（omega engineering）
移液管拉制器（David Kopf instruments）
各种直径和壁厚的 Pyrex 毛细玻璃管（drummond scientific）
小显微镜，光轴平行于工作台
目镜网格（edmund scientific），校准尺度适合于显微镜的目镜。

1. 剪一段直径为 25μm 的镍铬线（长约 30 cm），然后称重，并仔细测量长度。根据此重量/长度比率，得出较短一段镍铬线（将用于步骤 3）的质量。

2. 用移液管拉制器拔玻璃针。

   根据指南，在热量刻度 27 和牵拉刻度 10 条件下，用垂直拉制器拔 Pyrex 玻璃管，可制成有效偏向范围内的微型针。注意玻璃针直径应小于皱褶宽度，并能在微机械处理的底物（基本方案 2）内适用。

3. 将玻璃针固定于横置显微镜（其背面朝下，光轴与工作台平行）的载物台上，并悬挂一系列不同重量的镍铬线，其尖端远离玻璃针末端，从而校准玻璃针。然后，用目镜网格测量每种重量的镍铬线使玻璃针尖部的偏向。0.02～1.0 mg 线段可提供有效偏向范围。

4. 计算力［线的重量（g）×980 cm/s^2］与玻璃针尖部的偏向形成的曲线的坡度，从而得出玻璃针的不易移动性。

备择方案 1　用另一种聚合物检测细胞在起皱底物上的牵引力

与二甲聚硅氧烷底物相比，苯甲聚硅氧烷底物有几个优点，例如，适用于微分干涉显微镜，紫外线光照射后硬度可降低。

附加材料（又见基本方案 1 和备择方案 2）

三甲基末端的苯甲聚硅氧烷（Dow Corning 710 液）

紫外线灯，型号为 UVGL-58（UVP）

1. 用三甲基末端的苯甲聚硅氧烷代替二甲聚硅氧烷，预涂盖玻片。按基本方案 1 和备择方案 2 测量。

   此种聚硅氧的优点是折射系数高（1.536），适用于偏振光（微分干涉）和干涉反射显微镜技术。

2. 如果校准实验提示苯甲聚硅氧烷片太硬，通过紫外线照射使苯甲聚硅氧烷片变得较膨胀。用 UVGL-58 灯照射，将 6W 灯置于上方 15～20mm 处，λ＝ 254nm，即 15cm 表面照射功率为 $300\mu Wcm^2$。应重复校准实验。

备择方案 2　检测细胞在无皱褶底物上的牵引力

附加材料（又见基本方案 1）

真空润滑油或 Valap（见配方）

二甲聚硅氧烷（12 500 厘泊＊，Sigma）

微珠悬液（微珠直径为 1 μm，Polysciences）

无酚红培养液

用家用真空器除气的培养液

Pyrex 量筒（22mm×8 mm，Bellcon Glass）

＊厘泊，黏度单位。

盖玻片，用酸洗过
喷洒器（见支持方案 2）
真空源
喷洒涂层器（如 Electron Microscopy Sciences）。

1. 制作 Rappaport 培养皿，即用真空润滑油或 Valap 将 Pyrex 量筒封固于盖玻片（用酸洗过）上。
2. 将 60 mg 二甲聚硅氧烷注入每个培养皿，让其均匀扩展。
3. 用改制的喷洒器（见支持方案 2 的叙述）将直径 1 μm 微珠喷洒在二甲聚硅氧烷的表面上，密度约为 3×10^4 个/mm^2。
4. 让二甲聚硅氧烷内的气泡出来，或者真空除气。
5. 用喷洒涂层器使二甲聚硅氧烷凝胶上层充分结合，真空压强为 0.15 托*，离凝胶表面的高度为 60 mm。通直流电 2s，电压约为 2 mA。
6. 将除气的培养液注入凝胶上层已处理过的培养皿内。
7. 将培养皿放在显微镜载物台上。然后，将两根硬度相同并已校准过的微型针固定于显微操作仪上，再将微型针伸向凝胶片中央。
8. 同时使两根微型针靠近，以夹持凝胶片。
9. 以微型针的弯曲度测定凝胶片的硬度（力-微珠移动距离曲线）（Oliver et al. 1998）。
10. 将细胞悬液注入另一个凝胶上层已处理过的培养池内，孵育 1～3h，测量微珠移动距离。
11. 用凝胶片的硬度（在步骤 9 已测定）和细胞作用下微珠移动距离（在步骤 10 已测定）计算细胞产生的牵引力。

支持方案 2　制备改装的喷枪

喷洒器用于将微珠喷洒在聚合物涂布的盖玻片上。

材料

喷洒器（DeVilbiss 646）
干燥箱（16 L 容器，Nalgene）
T 形连接管
连接管
玻璃移液管，尖端开口的内径为 1mm
撞击取样器（37 mm Air Sampling Cassettes 4339，Gelman）

1. 将喷洒器的一端连于过滤空气的输送管，另一端连于干燥箱（16 L Nalgene 容器）。
2. 将干燥而滤过的空气以 5 psi 输送入干燥箱，此不受向喷洒器输送空气的影响。

* 托：毫米汞柱，1 托＝1mmHg

3. 在干燥箱输出侧安装 T 形连接管。用一段连接管将 T 形连接管的另一端与玻璃移液管相连。
4. 从上到下放置几个取样器盒内的轴，使撞击取样器扩展足以放入 Rappaport 培养皿。将含有除气聚硅氧 Rappaport 培养皿放入此较粗的撞击取样器内。
5. 将拉制的吸管放入撞击取样器顶部，并用有弹性的管连接。然后，将撞击取样器底部连向真空。
6. 将用乙醇配制的微珠悬液加入喷洒器，然后打开空气和真空开关。移动吸管，将微珠分散在聚硅氧上层。

推荐密度为 3×10^4 个微珠/mm^2。

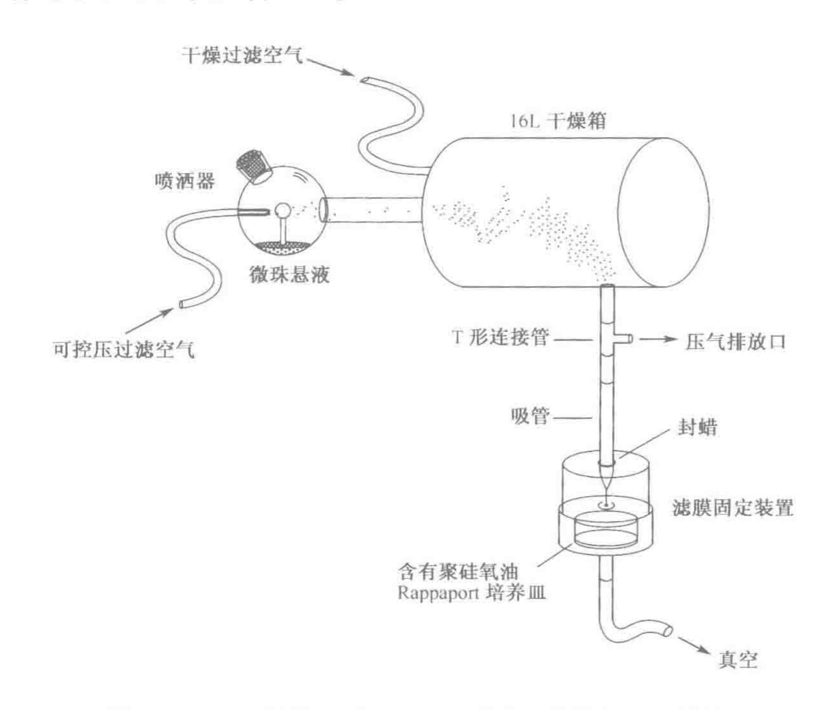


图 14.3.1 根据 Oliver 等（1995）发明改装的喷洒器的图解

此装置将液体中的微珠分散为单个干的微珠。喷洒器一端通入过滤空气，另一端连于干燥箱的输入侧。干燥箱的输入侧也通入过滤空气。干燥箱的输出侧与吸管（尖端内径为 1 mm）相连。吸管尖端伸入改装的撞击取样器内，撞击取样器内有加入聚硅氧油的 Rappaport 培养皿。吸管尖端可移动，以分散微珠

基本方案 2 测量在微机械制造的底物上的细胞牵引力

此方案叙述一种制备由微机械制造的底物以便于测量细胞下方牵引力的方法（见图 14.3.2）。

材料

50%（v/v）氢氟酸

合适的细胞外基质（ECM，如 40 μg/ml 层粘连蛋白）

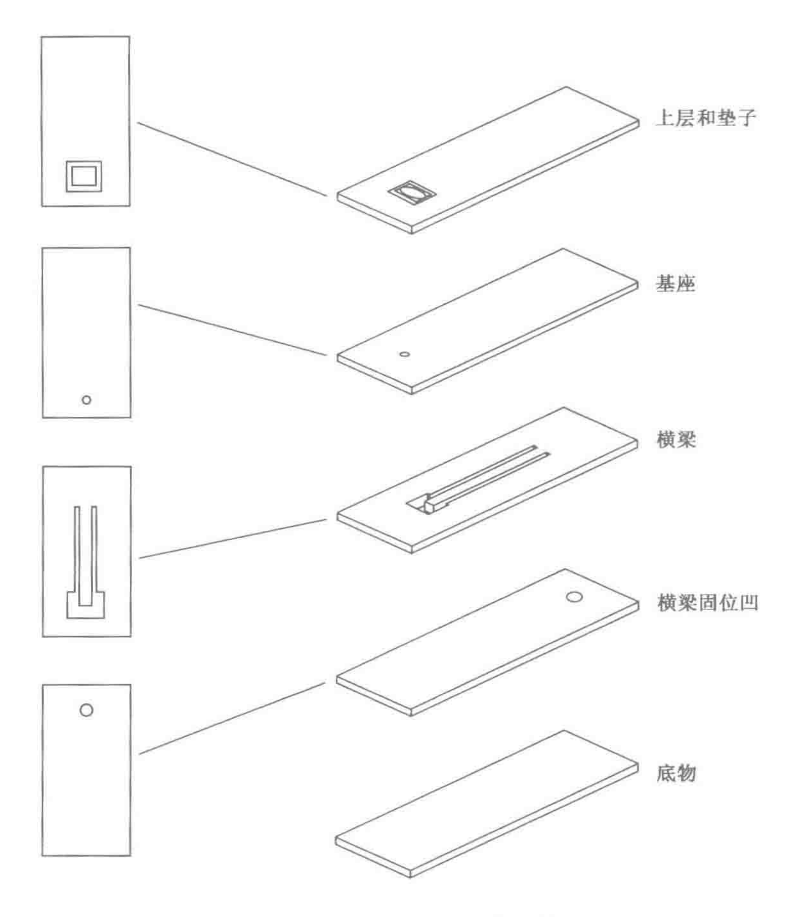


图 14.3.2 制造悬臂的面模和层面

用薄硅片作为底物。将磷酸硅酸盐玻片（PSG）放在硅片上面，有孔面模用于以平板印刷术模仿 PSG，形成光束定位凹。将多结晶硅放于 PSG 上。用有横梁和小凹的面模使这些结构成形。放置一层旋转涂布玻璃。另一层面模用于在横梁游离端放置一个小孔。然后，表面用含有血浆的无定形硅覆盖，以充填小孔，形成将垫子固定于横梁上的底座。最后一层面模用于蚀刻垫子和上层玻璃的方孔

50% $MgSO_4$（w/v）
无酚红培养液
微构建设备
计算机辅助绘图（CAD）软件包
极性反射管（见支持方案 3）
用于显微镜的荧光照明
红色滤片（645 nm）
克隆管
硅烷化盖玻片（见支持方案 3）
Sylgard 184（Dow Corning）

1. 联系购买微构建设备（如 MCNC 公司的设备，网址为 http://www.mcnc.org，E-mail地址为 pr@mcnc.org）。
2. 估计细胞将产生的牵拉力（Oliver et al. 1994）。除最佳估计外，可能将细胞牵拉力估计过高或过低。
3. 测定横梁的最大偏斜。

   通常为数微米，但实际偏斜度应取决于微机械制造的精确度。

4. 用下列等式确定合适的横梁硬度。

$$\text{横梁硬度} = \frac{\text{牵引力}}{\text{横梁偏移距离}}$$

5. 用下列公式计算横梁硬度的合适几何因数，这两个公式表示方形横梁的相关参数。

$$\text{横梁硬度} = \frac{3EI}{l}$$

$$I = \frac{h^4}{12}$$

   上两个公式中，E 是聚硅氧底物的 Young 模式系数，l 是横梁的长度，I 移动迟钝的瞬间，h 是横梁的高度（与宽度相等）。请注意，可通过虚构设施的约束限制横梁的高度和宽度。在 Oliver 等的装置情况下，E 为 145～160 GPa，横梁的高度和宽度为 2 μm，长度为 0.86～0.086 mm。根据这些几何参数，横梁的硬度为 89～0.09 nN/μm。此外，很长的横梁可能存在贴壁问题，横梁会贴于所在部位的侧壁。Oliver 等提出，他们使用最长的横梁时遇到过此问题，横梁常常不能移动。

6. 确定测量传感器（横梁）的方向和间距。

   此步骤确定每个单位的设计。重复多个单位，组成装置或芯片。在一块硅片上，可构建许多芯片。一个典型设计有 9 个重复单位，在一块硅片上构建约 40 个芯片。

7. 用 CDA 文件包设计出每个面模的机械制图，面模需用于制造重复单位的层面。
8. 用 CDA 绘图制造用于机械加工每个层面的面模。
9. 用微构建设备制造含有许多芯片的硅片，再将硅片切成小片，最后用 50%氢氟酸（HF）蚀刻，完成组装。

   注意： HF 是一种侵害性试剂，需要合适的保护服装和工具，如聚四氟乙烯（Teflon）容器和镊子。

10. 从芯片除去残留的 HF，以保证芯片的生物相容性。除去 HF 后，将芯片放入去离子蒸馏水中，浸泡 1 h，再在 50% $MgSO_4$ 中浸泡 2 h。
11. 用硅酮树脂（Sylgard）将克隆管粘在硅化盖玻片上，制成放置芯片的小室。
12. 将芯片放入小室，然后用预涂盖玻片的方法在芯片上面涂布细胞外基质（ECM）。
13. 将细胞悬液加入用克隆管制成的小室，让细胞附着于芯片。按基本方案 1 的步骤 5 确定细胞密度和培养时间。用偏振光反射显微镜观察芯片，此显微镜由偏振光反射立方体（见支持方案 4）和有荧光滤光片（645 nm 波长滤片）的显微镜组装，需要时可装温度控制系统。
14. 用校准微型针（见基本方案 1）校准该装置的可移动芯片。将校准硬度与理论计算比较。

支持方案3 硅烷化盖玻片

硅烷化盖玻片用于通过微机械制造的底物（见基本方案2）检测细胞牵引力的实验。

材料

20% HNO_3
丙酮，试剂级
六甲二硅氮烷（1，1，1，3，3，3-Hexamethyldisilazane），(HMDS，Aldrich)
70%乙醇
盖玻片和盖玻片架（Thomas Scientific）
Pyrex皿，盛盖玻片架
干燥箱
液氮罐，装有调节器
3ml注射器，带有针头

1. 将盖玻片放在盖玻片架上，在20% HNO_3中浸泡1h，再在Milli-Q纯净水中浸泡1h，最后在试剂级丙酮中浸泡数分钟。倒掉丙酮，风干。
2. 将盖玻片架放入Pyrex皿，用铝箔遮盖，在干燥箱（140℃）中烘烤1 h。
3. 用一个塑料袋收集氮气，然后用带有针头的3 ml注射器穿破塑料袋，抽2.5 ml氮气。将针头插入HMDS容器顶部，抽2.5 ml HMDS。注射器穿过铝箔，将HMDS注向Pyrex皿，涂布盖玻片。在干燥箱（140℃）中烘烤20 min。
4. 将干燥箱敞开5 min，揭去Pyrex皿上的铝箔，暴露15 min。然后，在干燥箱（140℃）中继续烘烤1 h。
5. 使盖玻片冷却，在70%乙醇中储存直至使用。在使用前，吸去盖玻片上的乙醇，风干。

支持方案4 制备偏光反射立方体

由于芯片不透明，观察微机械处理的底物（见基本方案2）须用干涉显微镜。虽然可以使用厂家制造的偏光干涉显微镜，但本方案提供一种改装实验室已有显微镜的简便方法，用于检测细胞牵引力时观察细胞。

材料

荧光滤片槽或立方体（可从显微镜厂家购买）
50-50镜（Chroma）
偏振器（Chroma）

1. 将 50-50 镜放于荧光滤片槽或装有二色性镜的立方体处。

2. 将偏振器放于正常放置激发滤片和发射滤片处，使两个偏振器处于相互垂直的位置。

参考文献：Burton and Taylor，1997；Galbraith and Sheetz，1997；Harris et al，1980；Oliver et al. ,1994，1995，1998

撰稿人：Catherine G. Galbraith and Michael P. Sheetz

单元 14.4　细胞损伤实验

无论从生物学或实用目的的角度出发，研究细胞损伤需要一些方法，来鉴别在细胞培养或组织内常少数存在的受伤细胞。

策略设计

根据用正常不能渗透的大分子示踪剂标记细胞质的原理鉴别受伤细胞（图 14.4.1）。细胞膜破裂，示踪剂进入细胞质，然后破裂处封闭，示踪剂位于细胞内。死细胞的细胞膜破裂后不能封闭，只要洗去全部外源性示踪剂则不被标记。有几种细胞损伤示踪剂供选择。荧光素标记的右旋糖酐比较便宜，不同分子质量（5000～2 000 000）的右旋糖酐均可使用。如果使用醛固定的标本，须用结合有赖氨酸的右旋糖酐。外加性

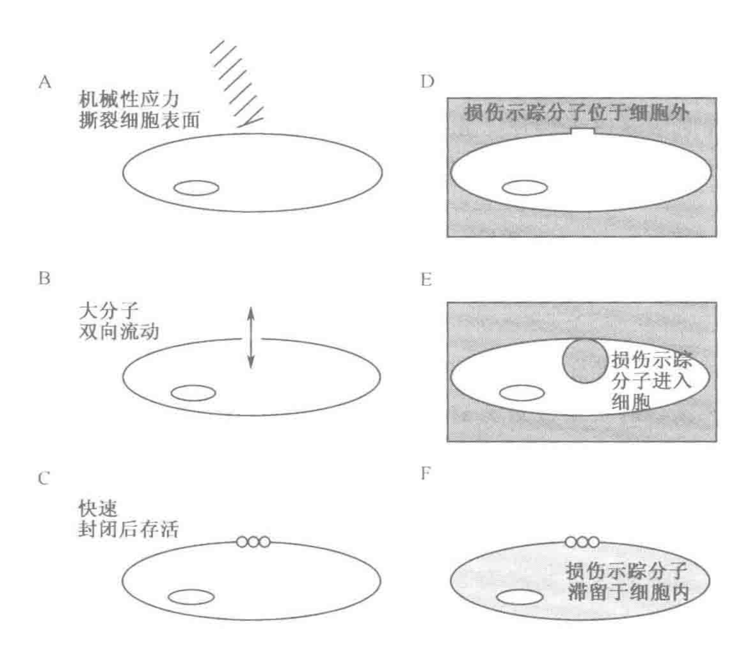


图 14.4.1　定义的细胞损伤和鉴定的细胞损伤

机械性应力引起细胞膜破裂（A），正常情况下不能渗透的分子可通过破裂处进出细胞（B）。损伤处迅速封闭（<5s，受钙离子介导的细胞膜移动和融合的调节），细胞存活（C）。在存在损伤示踪分子（正常情况下不能渗透）条件下发生细胞破裂时（D），示踪分子进入细胞内（E），细胞膜封闭时示踪分子滞留于细胞（F）。如果在显微镜测定或荧光测定方面可观察到损伤示踪剂，能够鉴定受伤细胞

示踪剂的优点是已知加入和除去示踪剂的时间，如荧光素标记的右旋糖酐。因此，可用于脉冲追踪（pulse-chase）标记方案，以便确定细胞损伤时间的选择。白蛋白是一种很好的细胞损伤示踪剂。在动物整体研究中，白蛋白的突出优点是高浓度时许多组织的细胞外环境保持正常。

注意：所有活体动物的实验方案须首先得到动物管理和使用委员会（IACUC）的检查和许可，或须执行政府关于实验室动物管理和使用的规则。

基本方案　用荧光素右旋糖酐检测培养单层细胞的损伤

材料（带√项见附录 1）

贴壁目的细胞（如人脐静脉内皮细胞，HUVEC；见单元 2.3）

细胞培养液（如含 10%FBS 的 DMEM，用于培养 HUVEC；Life Technologies）

√无菌 Dulbecco 磷酸缓冲盐水（DPBS，Life Technologies）

5mg/ml FDxLys 溶液：赖氨酸固定的荧光素右旋糖酐的分子质量为 10 000 mol. wt（Molecular Probes），用 DPBS 配制

3.7%（w/v）甲醛（Fisher），用 DPBS 配制（见方法）

抗漂白显微镜标本封固液（如 ProLong，Molecular Probes）

22mm×22mm×1mm 盖玻片（Fisher），通过酒精火燃灭菌

无菌 petri 皿（如有 4 个格的 100mm×15mm 皿，Falcon）

1. 将目的细胞放于火焰灭菌的盖玻片上，用合适的细胞培养液培养至形成理想的单层。
2. 用镊子从培养皿中取出盖玻片，先后放入两个盛有无菌 DPBS 的 50 ml 烧杯中浸洗 1 次。在每次浸洗后，将盖玻片边缘触及纸巾，吸去多余的 DPBS，但不要使细胞变干。
3. 将盖玻片的细胞面朝上，放于塑料 petri 皿的底壁上。培养皿应足够大，以便放下盖玻片。将 5 mg/ml FDxLys 溶液（100 μl）注于盖玻片上面，然后吸去，如此反复几次。
4. 建立可引起细胞损伤的实验条件。不要干扰阴性对照。

   可引起细胞损伤的机械性应力的举例如下：一是培养液在细胞上面或周围流动而产生的切应力，二是对细胞或其底物压迫或牵张而产生的张应力。以 FDxLys 作为阴性对照，不会产生机械性干扰。
5. 作为阳性对照，用单刃剃须刀刮盖玻片约 10 次。用位相差显微镜观察，以确保用此方法从底物上刮除细胞（宽度为 2～4 个细胞）。
6. 受伤细胞后示踪剂处理时间应尽量短。按照实验步骤 2 清洗全部盖玻片，然后加入培养液，将培养皿放入培养箱，使细胞在理想时间内尽快恢复至正常培养状态。
7. 用 DPBS 将每片盖玻片清洗 3 次，然后用 3.7%甲醛浸泡 10～30 min。
8. 用蒸馏水将盖玻片洗 2 次，然后按照厂家的使用说明用抗漂白封固液封片。取标准荧光滤片，在荧光显微镜下观察。

备择方案 1　用荧光素右旋糖酐检测哺乳动物组织的损伤

此方案叙述在完整动物通过生理或病理机械性切力引起损伤时对受伤细胞的检测。在动物体内，注入和除去示踪剂以及细胞固定很有效，通过血管系统排出试剂（示踪剂、洗液和固定液）对组织的干扰很小。

注意：由于新配制的甲醛溶液的高反应性和易挥发性，应将灌流器和被灌注动物放入保护罩内。

材料（带√项见附录 1）

雄性 Sprague-Dawley 大鼠（250 g）
赖氨酸固定的荧光素右旋糖酐（FDxLys，分子质量为 10 000 mol. wt.；Molecular Probes）
√无菌 Dulbecco 磷酸缓冲液（DPBS，Life Technologies）
1%普鲁卡因（w/v），用 DPBS 配制，37℃
4%和 8%新鲜甲醛溶液（w/v），用 DPBS 配制
10%、20%和 30%蔗糖溶液（w/v），用 DPBS 配制
组织 Tek OCT 复合物（Fisher）
OCT 蔗糖溶液：含 50% OCT 复合物（v/v）和 30%蔗糖异戊烷，用 DPBS 配制
液氮
√100 mmol/L Tris · Cl，pH 7.0
抗漂白显微镜标本封固液（如 ProLong，Molecular Probes）
500 ml 容器
塑料管，长 0.3 m，内径 0.2 mm
塑料管，长 1.5 m，内径 0.1 mm
三向瓣
钝头插管，长 5 cm，内径 1～2 mm
18 G 针头
1 ml 注射器
恒冷切片机
合适黏附剂涂布的耐超冷的显微载玻片（Fisher）

1. 在保护罩内，放置两个 500 ml 容器。通过两条长 0.3 m 和内径 0.2 mm 的塑料管将容器与三向瓣相连，再通过一条长 1.5 m 和内径 0.1 mm 的塑料管将三向瓣的第三端与长 5 cm 和内径 1～2 mm 的钝头插管相连。将盛有液体的容器放于动物上方，高度≥1 m，以便产生合适的灌流压力（见图 14.4.2）。
2. 以抓颈部或肩区的皮肤将雄性 Sprague-Dawley 大鼠抓起，另一只手用带有 18G 针头的 1 ml 注射器向腹膜腔内注射 0.25 ml 含有 FDxLys（约 400 mg/kg 体重）的无菌 DPBS。

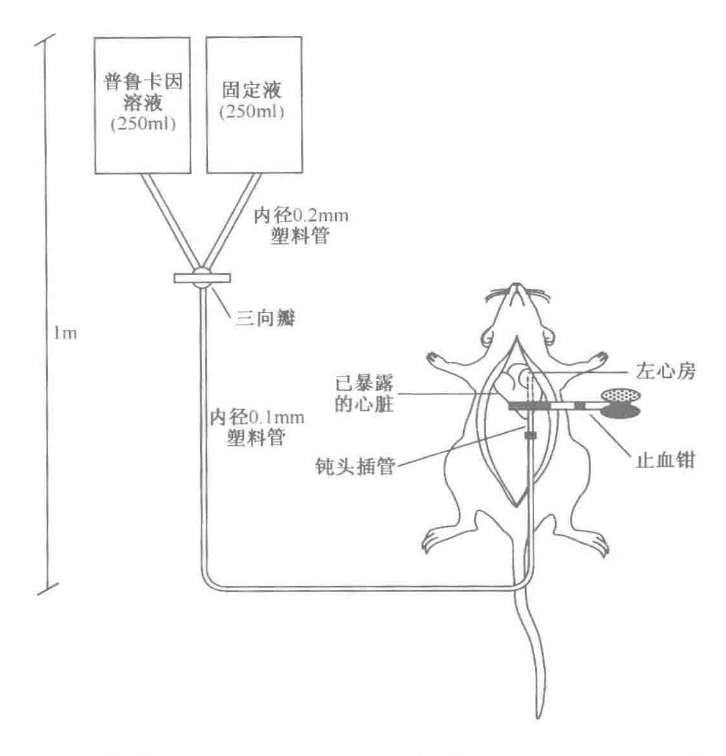


图 14.4.2 原位损伤后灌流系统。将普鲁卡因溶液和固定液放于实验动物上方，高度≥1 m。通过三向瓣和 5 cm 长插管将液体连续灌注入左心房

3. 使动物处于目的实验条件下（如锻炼或注射增强收缩力的试剂）。
4. 腹膜腔注射戊巴比妥（200 mg/kg 体重），深麻醉大鼠。将动物放在解剖板上，用外科用纱带固定前肢，使肱三头肌处于非牵拉和非收缩状态。
5. 使三向瓣处于关闭位置，将 250 ml 热的（37℃）1%普鲁卡因溶液装入灌流器的一个容器，将 250 ml 8%甲醛溶液装入另一个容器。排出塑料管内的气泡。
6. 在大鼠腹壁作较小的横行切口。经此切口进入腹膜腔，沿动物腹壁全长作纵行切口，暴露腹腔器官。然后，显露胸廓，用较小的外科剪穿刺膈，快速剪除膈，暴露心脏。
7. 在左心室尖部，作一小切口（0.2 mm）。打开灌流器的三向瓣，使普鲁卡因溶液流动。经小切口插入钝头插管，将插管末端置入近于主动脉弓的左心房内。在合适位置用止血器夹住插管，使灌流液除流经主动脉外不能流出心脏。用普鲁卡因溶液灌注动物。
8. 开始灌注普鲁卡因后数秒后，在右心房作切口，使血管内的灌流液流出。灌注 250 ml 普鲁卡因溶液。

   如果肝内血液被清除（即深红色变为浅褐色），已达到足够的全身灌流（除心脏）。
9. 打开三向瓣，灌注甲醛溶液，不要让空气进入三向瓣。向动物灌注 250 ml 甲醛溶液。用含有该固定液的吸收性垫子填充体腔，将动物放置于保护罩 1h。
10. 仔细切除目的组织或器官，将其放入新鲜的 8%甲醛溶液中，过夜。用 DPBS 快速清洗组织 1 次，然后将组织切成适当大小的小块，以便于包埋和冰冻切片。

11. 连续用10%、20%和30%蔗糖溶液和OCT蔗糖溶液浸组织块，两种溶液分别浸24 h。
12. 将已浸过组织块在OCT复合物中浸泡3h，然后用液氮预冷的异戊烷慢慢地将组织块冻在切片座上。
13. 用恒冷切片机将组织块切成10 μm厚冰冻切片，然后取于黏附剂涂布的耐超冷的显微载玻片上。在室温条件下，用4%甲醛溶液后固定切片10 min。用100 mmol/L Tris·Cl（pH 7.0）洗切片5 min，然后用抗漂白显微镜标本封固液和盖玻片封片。
14. 直接用装有标准荧光滤片的荧光显微镜观察切片。

备择方案2 以白蛋白作为损伤示踪剂检测细胞损伤

特别注意：二氨联苯胺（DAB）有致癌作用。处理DAB时应戴手套，并在保护罩内进行。用漂白剂处理含有DAB的溶液和污染的物品，然后根据研究机构对于危险化学品的管理规定弃掉。

注意：除特殊情况，所有染色都在室温条件下进行。

附加材料（同见基本方案和备择方案1；带√项见附录1）

10mmol/L 氯化铵溶液，用DPBS配制
0.1% Triton X-100溶液（v/v），用DPBS配制
清洗缓冲液：0.05% Triton X-100溶液（v/v），用DPBS配制
H_2O_2/NaN_3/DPBS：0.3%过氧化氢（v/v）和2%叠氮化钠，用DPBS配制（使用前将储存的过氧化氢加入叠氮化钠）
热灭活羊血清（Life Technologies）
结合羊抗鼠血清白蛋白（RSA）多克隆抗体的辣根过氧化物酶（HRP）（Organon Teknika Cappel）
√100 mmol/L Tris·Cl，pH 7.0
装有3，3′-二氨联苯胺（DAB）的HRP底物试剂盒（Vector Laboratories）
50%、75%、90%、95%、99%和100% EM级乙醇（v/v）
EM级二甲苯
永久性封固液（如Cytoseal 60，Stephen's Scientific）

1a. 培养的细胞单层实验：按已述方法（见基本方案，步骤1～7）准备实验和对照的培养细胞，但用5 mg/ml大鼠血清白蛋白取代5 mg/ml FDxLys（基本方案，步骤3）。
1b. 组织实验：按已述方法（见备择方案1，步骤1～13）准备实验和对照的组织切片，但省略FDxLys注射。
2. 用DPBS洗标本两次，然后用10 mmol/L氯化铵溶液孵育30 min，从而使反应性醛类灭活。
3. 为了通透组织切片，用0.1% Triton X-100溶液孵育5 min。然后，用清洗缓冲液浸洗5 min。

4. 为了阻断内源性过氧化物酶的作用，用 H_2O_2/NaN_3/DPBS 孵育 30 min。然后，用清洗缓冲液浸洗 5 min。为了阻断非特异性蛋白的结合，用含 4%热灭活羊血清(v/v)的清洗缓冲液孵育组织切片 1 h，然后用清洗缓冲液浸洗 5 min。在 4℃条件下，用结合羊抗 RSA 多克隆抗体的 HRP（用清洗缓冲液和 1%羊血清配制）孵育过夜。
5. 用清洗缓冲液洗 5 次，再用 100 mmol/L Tris 缓冲液洗 2 次。
6. 按厂家说明准备新鲜的 HRP 底物缓冲液，然后在黑暗条件下用底物缓冲液孵育组织切片 30 min。用蒸馏水洗组织切片 5 min，然后逐级用乙醇脱水，50%、75%、90%、95%、99%和 100%乙醇各 10 min。
7. 用新鲜二甲苯孵育 10 min 以上，期间换液 2 或 3 次。然后，用永久性封固液封片，在光学显微镜观察。

参考文献：McNeil，1989；McNeil and Steinhardt，1997；McNeil et al. ,1984

撰稿人：Paul L. McNeil，Mark F. S. Clarke and Katsuya Miyake

单元 14.5　盘基网柄菌属细胞动力学

盘基网柄菌是最适于且易于进行遗传学研究的细胞，可用于进行细胞分裂、运动、吞噬、趋化和信号转导等基本的细胞功能以及细胞分选、类型形成和细胞类型鉴定等细胞发育学方面的研究。

基本方案 1　观察单个活细胞内 GFP 标记的蛋白质

材料（带√项见附录 1）

转化的盘基网柄菌属细胞（见支持方案 1），表达理想的绿色荧光蛋白（GFP）融合蛋白
√磷酸缓冲液（PB）
√发育缓冲液（DB）
合适终浓度的环腺苷酸（cAMP 钠盐）储存液，仅用于发育细胞
装有照相机（配备充电器，CCD）、水银灯光源和合适滤片（用于 GFP 图像）的倒置显微镜
装有 IPLab-Spectrum 获取软件（Scanalytics）或 Openlab 获取软件（Improvision）的计算机
有池盖玻片（如 Lab-Tek II，Nalge Nunc International）
适合装于标准载物台的铜片夹
连有计时器的蠕动泵（仅用于发育细胞）

1. 安放倒置显微镜及其硬件。
2. 将 IPLab-Spectrum 或 Openlab 获取软件（控制图像获取）装入计算机。

用快门将曝光时间控制在最短，并用中密度滤片和 UV 滤片将荧光的激发光控制

在最低限度。

3. 将有池盖玻片固定于标准载物台的片夹上。

生长细胞实验

4a. 使盘基网柄菌属细胞在液体培养基内或菌苔上生长至停滞期。计数细胞（单元1.1），用PB将细胞稀释至1×10^6个/ml，将4 μl细胞悬液（4000个细胞）注于有池盖玻片上。让细胞贴壁5min。

5a. 轻轻添加PB，覆盖盖玻片上面。然后观察GFP的表达情况。

成熟细胞实验

4b. 使盘基网柄菌属细胞在液体培养基内生长至停滞期，将细胞悬液按50 ml分放入锥形管中。在22℃条件下离心（1500 *g*）4 min，用DB洗细胞，然后再次离心。收集和计数细胞（单元1.1），在烧瓶内用DB混悬细胞，密度为1×10^6个/ml。在22℃条件下，振荡（100r/min）1h。

5b. 为了使发育达到最佳化，在振荡（100r/min）4～5 h过程中通过连有计时器的蠕动泵每隔6 min添加cAMP储存液（终浓度为75 nmol/L）。

6b. 取1 ml细胞悬液，在22℃条件下离心（1500 *g*）4 min，然后用1 ml PB混悬细胞。通过涡漩使细胞簇散开。用PB将细胞稀释20倍，然后将4 μl细胞悬液注于固定的有池盖玻片上。让细胞贴壁5 min。

7b. 轻轻添加PB，覆盖盖玻片上面。然后观察GFP的定位情况。

备择方案1 普遍加入化学吸引剂后的GFP标记蛋白的图像记录

能够在基本且未刺激状态下研究GFP融合蛋白的分布，故不但能检测细胞的随机运动，而且能检测生长细胞的分裂和吞噬等过程。另外，受体刺激对于GFP标记蛋白定位的作用能够容易地在成熟细胞检测。

材料（带√项见附录1）

转化的盘基网柄菌属细胞（见支持方案1），表达理想的绿色荧光蛋白（GFP）融合蛋白

√发育缓冲液（DB）

合适终浓度的环腺苷酸（cAMP钠盐）

√磷酸缓冲液（PB）

装有照相机（配备充电器，CCD）、水银灯光源和合适滤片（用于GFP图像）的倒置显微镜

装有IPLab-Spectrum获取软件（Scanalytics）或Openlab获取软件（Improvision）的计算机

八室盖玻片（Lab-Tek II，Nalge Nunc International）

连有计时器的蠕动泵

1. 安放倒置显微镜以及相关硬件。
2. 将 IPLab-Spectrum 或 Openlab 获取软件（控制图像获取）装入计算机。

   用快门将曝光时间控制在最短，并用中密度滤片和 UV 滤片将荧光的激发光控制在最低限度。

3. 将八室盖玻片固定于标准载物台的片夹上。
4. 使盘基网柄菌属细胞在液体培养基内生长至停滞期，然后将细胞悬液按 50 ml 分放入锥形管中。在 22℃条件下离心（1500 *g*）4 min，用 DB 洗细胞，然后再次离心。收集和计数细胞（单元 1.1），在烧瓶内用 DB 混悬细胞，密度为 2×10^7 个/ml。振荡（100r/min）1h。
5. 为了使发育达到最佳化，在振荡（100r/min）4～5 h 过程中通过连有计时器的蠕动泵每隔 6 min 添加 cAMP（终浓度为 75 nmol/L）。
6. 取 1 ml 细胞悬液，在 22℃条件下离心（1500 *g*）4 min，然后 1 ml PB 混悬细胞。通过涡旋使细胞簇散开。用 PB 将细胞稀释 20 倍，然后将 4 μl 细胞悬液注于八室盖玻片的每个池内。让细胞贴壁 5 min，然后在每个池内加入 300 μl PB。
7. 将盖玻片固定在倒置显微镜上，并使获取软件处于实时模式。

   阿米巴的直径约为 10～20 μm。用 63 倍或 100 倍油镜可增加立体分辨率和亮度，得到最佳观察结果。

8. 启动获取程序，在添加 cAMP 前记录图像，每个池记录 4 或 5 个图像。
9. 在记录两个图像之间，将 30 μl cAMP 储存液小心地加入池内。

   此步骤的稀释系数为 10。制备 cAMP 储存液，最终浓度为 10^{-9}～10^{-5} mol/L。

10. 完成数据获取，再移至另一池，添加不同浓度的 cAMP，重复步骤 8 和步骤 9。

备择方案 2　化学吸引剂梯度作用下的 GFP 标记蛋白的图像记录

通过观察化学吸引剂梯度作用下的细胞能够检测趋化细胞内的 GFP 融合蛋白的立体定位。

附加材料（见基本方案 1 和选择方案 1）

10^{-5}～10^{-6}mol/L 环腺苷酸（cAMP 钠盐）

单室盖玻片（Lab-Tek II，Nalge Nunc International）或可放入 35 mm 盖玻片的 Attofluor 细胞培养室（Molecular Probes）

用拉制的毛细玻璃管制成的微吸管，尖端内径约 0.5μmol/L（如 Femtotips，Eppendorf Scientific 公司的产品）

微注射器（如 Eppendorf Scientific 公司的产品）

1. 安放倒置显微镜，按已述方法（见选择方案 1，步骤 1～6）准备成熟的转化盘基网柄菌属细胞。
2. 将盖玻片或细胞培养池固定在倒置显微镜上。

3. 将 10^{-5}～10^{-6} mol/L cAMP 吸入微吸管，再将微吸管紧紧固定于微注射器。
4. 应用相差光学和 40 倍油镜仔细地将微吸管置于一群细胞附近。
5. 将微注射器调至手动模式，补偿压力约为 20 hPa。
6. 使获取软件处于实时模式，每 15s 记录 1 个图像，然后获取数据。

基本方案 2　聚集细胞群和损伤细胞的 GFP 标记蛋白的图像记录

GFP 标记细胞可用于研究盘基网柄菌属阿米巴虫多细胞发育过程中的细胞运动类型。将未表达 GFP 细胞和在固有启动子作用下表达 GFP 的细胞混合可达到此研究目的。另外，GFP（和/或 GFP 的颜色变异体）可与细胞特异性启动子融合，故能观察活生物的不同类型细胞。此技术不仅用于观察野生型生物，而且可用于精确研究突变型生物的发育缺陷。

材料

转化的盘基网柄菌属细胞（见支持方案 1），生长在无营养琼脂上（见支持方案 2）
聚硅氧油（如 Dow Corning 200/20cs，BDH Chemicals）
培养箱，22℃
Attofluor 细胞培养室（Molecular Probes），可放入 35 mm 盖玻片（可选择）

1. 按已述方法安放倒置显微镜和有关硬件（见基本方案 1）。
2. 将生长在无营养琼脂上的转化的盘基网柄菌属细胞放于培养箱（22℃），培养至形成聚集细胞群或细胞簇（约 6～9 h）。
3. 直接将含有盘基网柄菌属细胞的 35 mm petri 皿固定于倒置显微镜上，然后用 10 倍物镜观察。
4. 高放大倍数（20 倍、40 倍、63 倍）观察：用解剖刀将含有聚集细胞群或细胞簇的琼脂切成小块，然后将琼脂小块放于单室盖玻片或盛有 35 mm 盖玻片的 Attofluor 细胞培养皿，侧面朝下。
5. 轻轻取起琼脂小块，将其翻转，然后将其放于盖玻片上面，细胞面朝下，由此细胞簇被挤压在玻片上。用聚硅氧油注满培养皿，以预防琼脂干燥。
6. 将培养皿固定于显微镜上，开始获取数据。

支持方案 1　质粒构建和转化

利用整合载体或游离载体能够建立盘基网柄菌属阿米巴转化系。游离载体携带 Ddp1 序列，此序列在每个细胞可扩大 100 拷贝。肌动蛋白 15 启动子和 2H3 终止子表达试剂盒用于建立表达 GFP 的细胞系。此试剂盒引起固有蛋白高水平表达，而染色体外载体很少或不引起细胞克隆相互之间的蛋白表达变异。由于盘基网柄菌的基因组约占 70% A+T，应使用 *recA* 细菌染料扩增质粒。为了转基因，核糖体结合部位（RBS）须位于被表达基因的 ATG 之前。9 个核苷酸的 RBS 序列（TTATAAAAA）已常规用

于各种基因的固有表达。

研究盘基网柄菌的一种蛋白（通过同源重组引起的该蛋白缺失可产生一种表型）的分布时，基因替换成为检测 GFP 融合蛋白功能的强有力工具。使用游离载体时，应在细胞生长整个过程进行细胞筛选。

注意： 除特殊情况，全部操作都在冰上无菌进行。

材料（带√项见附录 1）

在液体培养基生长至停滞期的盘基网柄菌属细胞
√电穿孔缓冲液（EB），用冰预冷
GFP 融合蛋白编码的超螺旋 DNA 载体
√100 mm SM 培养板
√愈合溶液
√HL5 培养液
√20 mg/ml G418 溶液（w/v）
克雷伯（Klebsiella）产气杆菌，用于准备菌苔
电击杯（电极间隔 0.2 cm，如 Bio-Rad），用冰预冷
电击仪（Gene Pulse II 和 Bio-Rad 公司的产品）
有振荡器的培养箱，22℃
24 孔培养板

1. 将在液体培养基生长至停滞期的盘基网柄菌属细胞分注入无菌 50 ml 锥形管，每管 50 ml。在 22℃条件下离心（1500 *g*）4 min，计数细胞（单元 1.1）。然后，用冰预冷的 EB 混悬细胞，密度为 4×10^7 个/ml。
2. 取 400 μl 细胞悬液，在无菌微型离心管中与 5～10 μg GFP 融合蛋白编码的超螺旋 DNA 载体混合，然后在冰上孵育 4 min。
3. 将细胞移入电击杯，然后将电击杯放入电击仪内，在 1.1～1.2 kV 和 3 μF（用 5 Ω 电阻）条件下电击，按电击杯顺序进行。
4. 将电击杯移入冰内，孵育 10 min。
5. 用无菌 Pasteur 吸管将电击过的细胞移入 100 mm 组织培养板，加入 2 μl 愈合溶液，轻轻混合。在室温条件下，孵育 15 min。
6. 加入 12 ml HL5 培养液，在培养箱（22℃）内培养过夜。
7. 将 G418 溶液稀释至 20 μg/ml。
8. 当细胞生长至单层时，分离细胞克隆。将细胞放于 Klebsiella 产气菌苔上，每个培养板约 100 个细胞，在 22℃条件下培养 4～5 天。
9. 刮起菌苔边缘，将菌苔移入含有 HL5 培养液（添加 20 μg/ml G418）的 24 孔培养板，从而筛选单个细胞克隆。
10. 通过免疫印迹（单元 7.7）和显微镜观察分析单个细胞克隆的 GFP 表达（见基本方案 1、2、3 和备择方案 1、2）。

支持方案 2 细胞在无营养琼脂上发育的表型筛选

GFP 融合蛋白的功能可通过确定该蛋白质是否和野生型细胞在不发育状态下表达时的行为相同来进行评价。

材料（带√项见附录 1）

在液体培养基生长至停滞期的转化盘基网柄菌属细胞
√发育缓冲液（DB）
√发育缓冲琼脂（DB 琼脂）
直径 35 mm petri 皿
培养箱，22℃

1. 将在液体培养基生长至停滞期的转化盘基网柄菌属细胞以 50 ml 分装入无菌锥形管，在 2℃条件下离心（1500 *g*）4 min，用 DB 洗细胞。然后再次离心，计数细胞（单元 1.1），用 DB 混悬细胞，密度为 1×10^7 个/ml。
2. 将 1 ml 细胞悬液移入含有 0.5 ml DB 琼脂的直径 35 mm petri 皿内，让细胞贴壁 5 min。然后，将 petri 皿倾斜 5 min，吸去多余的缓冲液，风干 2 min。
3. 放上培养皿盖，将培养皿放入培养箱（22℃）内，在湿润条件下储存。
4. 适当评价细胞的发育。

能够记录细胞的发育程序，使 24 h 压缩至几分钟。此记录可通过将摄像机连于显微镜和用实时录像机捕获图像来完成。为了得到最佳结果，应使用低放大倍数的物镜（2.5～5 倍）。由于细胞对高温敏感，应注意使用很微弱的光源。因此，GFP 融合蛋白的功能可通过比较转化细胞系和野生型细胞的表型容易地评价。野生型细胞发育程序的综合分析可见 Kessin（2000）的论文和参考文献。

互联网信息

http：//dicty. cmb. nwu. edu/dicty/dicty. html

参考文献：Kessin，2000；Parent and Devreotes，1999；Sussman，1987；Spudich，1987

撰稿人：Carole A. Parent

（王海杰 译）

第 15 章　细胞器运动

真核细胞的细胞质由复杂的微丝网络构成，这些微丝网络包括遍布整个细胞质的微管和肌动蛋白。当细胞发生变形、分裂以及与环境相互作用时，这些微丝能进行高度地动态变化，并且可以不断地重新塑型。微丝网络在细胞的不同区域通过连接各部分蛋白质和细胞器对细胞质的构成起着关键作用。例如，已知微管可提供细胞器之间的通讯途径，控制这些细胞器的空间位置。另一方面，肌动蛋白微丝能与肌球蛋白结合，形成具有收缩性的微丝束，介导肌肉收缩和细胞质分裂过程中收缩环的形成。本章叙述的实验是用于检测微管和肌动-肌球蛋白微丝系统的特征和功能。这些实验对于鉴定将微管连接到细胞器的辅助蛋白和/或调节肌球蛋白分子沿肌动蛋白纤维滑动的辅助蛋白都是很有用的。单元 15.1 叙述一种用于检测微管和游离细胞器之间关系的体外实验方法。单元 15.2 提供一种用于研究肌动蛋白通过肌球蛋白移动的运动实验方法。

GFP 融合蛋白的应用提供了一种直接在显微镜下观察不同细胞器的方法，彻底革新了细胞器运动的研究。实际上，任何一种蛋白质都可以用 GFP 标记，在细胞内表达，然后应用蓝光进行观察。单元 15.3 叙述如何使 GFP 融合蛋白在植物中表达和成像，以便于研究这些细胞类型中的细胞器动力学。

细胞核运动（单元 15.4）发生于多种细胞类型中，包括刚形成的受精卵、肌肉、神经和分裂的细胞。对于细胞，确切地定位细胞核和周围的内膜系统是极其重要的。单元 15.4 叙述了一种用于监视来自蛙卵细胞原核的胞核体外运动实验方法。

撰稿人：Jenniter Lippincott-Schwartz

单元 15.1　微管/细胞器运动实验

单元 15.1 叙述一种用录像增强微分干涉差（VE-DIC）显微术观察游离细胞器组分与微管（MT）之间能动关系的体外实验方法，以便于剖析有关细胞器运动和膜运输的分子机制。

基本方案　微管/细胞器运动实验

材料（带√项见附录 1）

轴丝片段（见支持方案 2）

高尔基或内质网膜（见支持方案 5）

45 μmol/L 纯化的脑微管蛋白（见支持方案 3）

大鼠肝细胞溶胶（见支持方案 4）

√PM 缓冲液

含有 1 mmol/L GFP 的 PM 缓冲液

√20×能量再生系统

15 mmol/L MgGTP，用 PM 缓冲液稀释 100mmol/L MgGTP 储备液配制（见配方）

√Valap

简单灌流室（见支持方案 1）

切成 2 cm^2的滤纸

用 90mm 玻璃 petri 皿制备的湿盒，内含湿纸巾

高分辨 VE-DIC 显微镜系统（如 1998 年 Salmon 和 Tran 所述或类似产品）

1. 将等分量的轴丝、高尔基或内质网膜、45μmol/L 纯化的脑微管蛋白、大鼠肝细胞溶胶和 20×能量再生系统快速融化，立即放于冰上。用 PM 缓冲液将轴丝稀释至在支持方案 2 中确定的合适浓度。用含 1mmol/L GFP 的 PM 缓冲液稀释细胞器，制备 6×高尔基或内质网膜（见支持方案 5，步骤 9）
2. 在冰上，制备 30 μl 膜混合物：
   5 μl 6×高尔基或内质网膜
   1.5 μl 20×能量再生系统
   10 μl 45 μmol/L 纯化的脑微管蛋白
   1 μl 15 mmol/L MgGFP
   12.5 μl 细胞溶胶
3. 使吸管靠近灌流室开口端，将约 10 μl 稀释的轴丝慢慢加入简单灌流室中，使灌流室充满（见图 15.1.1）。将灌流室放入湿盒内，在室温下孵育 10 min，使轴丝附着于盖玻片上。
4. 将吸管靠近灌流室开口端，慢慢加入 10 μl PM 缓冲液，洗去未附着的轴丝。与此同时，用方形滤纸的尖端从灌流室的对侧吸去多余的缓冲液。然后，重复洗两次以上。
5. 用 10 μl 含 1mmol/L MgGFP 的 PM 缓冲液稀释 5 μl 45 μmol/L 微管蛋白。将稀释的微管蛋白注入含清洗过的轴丝的灌流室内。在玻片的顶面和底面各放一滴浸渍油，然后将载玻片转移到 VE-DIC 显微镜载物台上。

   简要地说，显微镜系统用 HBO 100-W 汞弧灯泡照明，经导光纤维振动器将光源输入垂直的显微镜台，此显微镜装有 DIC 图像生成的光学组件。在 Kohler 照明经 1.4-NA油浸聚光器聚焦到标本上之前，照明需通过 IR 反射和 546 nm 窄带滤片。用 100×的 1.3 或 1.4-NA 物镜收集光，并放大 1.25×，然后用特级 Newvicon 管型视频摄像机（Hamammatsu C2400 类似产品）收集图像。用实时图像处理器（Hamammatsu Argus 10 类似产品）通过图像平均、降低背景和增强对比度技术处理视频信号，然后实时记录到高分辨 S-VHS 录像带上。
6. 用 100×物镜聚焦在轴丝上。将载玻片在载物台上放正，以便使形成灌流室的双面胶带的 1 个边正好将显微镜聚光镜的照明区平分为二。将 100×物镜浸在油中，在胶带

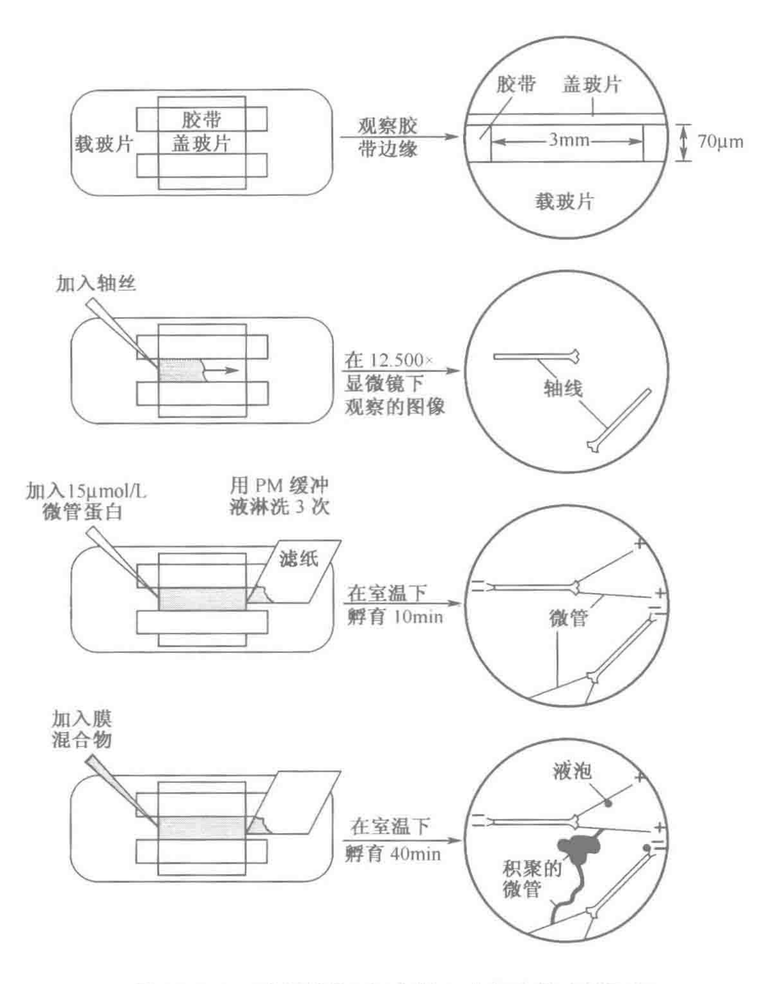


图 15.1.1 进行微管/细胞器运动实验的流程图解

的边缘聚焦。观察胶带的边缘，倒转微调旋钮，直至胶带最边缘离开焦距。移动载玻片，使物镜在铺有轴丝的区域内，此时应使物镜十分接近焦点。

7. 通过调节显微镜的 Kohler 照明，使图像处于最佳状态，从而观察单条微管。利用实时图像处理器降低背景和增强反差，使图像平均。当单条微管离开轴丝成核时，观察微管聚合的动力学图像，并用 S-VHS 录像带记录。
8. 在微管动力学的观察过程中，将膜混合物预热至室温。将 12 μl 膜混合物注入显微镜台上的简单灌流室内。用一滴熔化的 Valap 将灌流室两边密封。观察并记录细胞器和微管之间的动力学关系。如果需要，可将药理学试剂（表 15.1.1）加入膜混合物中，即将试剂加入混合物，然后调整所有成分的浓度，在加入灌流室前，将混合物在 37℃条件下孵育 15 min。

通常需要 45 min 才能使微管发生运动。如果运动不发生，可升高室温。

表 15.1.1 加入膜混合物[a]的药理学试剂

药理学试剂	终浓度	作用	储备液	12 μl膜混合物中加入量
布雷菲德菌素 A	60 μmol/L	除去高尔基被覆蛋白	使用前，用 PM 缓冲液（1∶1）稀释 1.5 μl 用乙醇[b]配制的 3.6 mmol/L Brefeldin A 储备液	3 μl
氟化铝		活化异三体 G 蛋白		加入 1μl 30×NaF[b] 和 1 μl 30×$AlCl_3$[b]
MgGTP-γ-S	1 mmol/L	活化异三体 G 蛋白	30 mmol/L MgGTP-γ-S[b]	1 μl
MgAMP-PNP	1 mmol/L	抑制激酶样蛋白[c]	150 mmol/L MgAMP-PNP[b]	1 μl
原钒酸钠	25 μmol/L	抑制胞浆动力蛋白[d]	用 PM 缓冲液稀释 1μl 100 mmol/L 储备液	1 μl

a. 见附录 2R。

b. 见溶液配制操作说明。缩写：MgAMP-PNP，5′adenylylimidodiphosphate magnesium salt；PM，plasma membrane。

c. Vale et al. 1985.

d. Shpetner et al. 1988.

支持方案 1 简单灌流室和盖玻片的制备

材料（带√项见附录 1）

Versa 清洁皿去污剂（Fisher）

√1 mmol/L EDTA

70%和 100%乙醇

22mm×22mm No. 1.5 盖玻片（Corning）

水浴超声波处理器

双面胶带

Clay-Adams 预清洁的 Goldseal 3in×1in 载玻片（Becton Dickinson）

Dumont No. 5 镊子

1. 在 500 ml 玻璃烧杯内注入半杯含有约 5 ml Versa 清洁皿去污剂的热自来水，然后取 3 盒盖玻片，每次 1 盒，放入烧杯。小心地分开粘在一起的盖玻片，在水浴超声波处理器中超声处理 45 min。

   为了使微管/细胞器运动实验具有可重复性，灌流室和盖玻片必须是非常清洁。

2. 在下列溶液中通过涡旋提示的次数清洗盖玻片，然后在同样的溶液中超声处理 1 次，时间为 30 min：

   用热自来水清洗 10 次

   用双蒸水清洗 10 次

   用 1 mmol/L EDTA 清洗 3 次

   用 70%乙醇清洗 3 次

   用 100%乙醇清洗 3 次

3. 用 100%乙醇将盖玻片清洗 1 次，然后将清洁的盖玻片移入 500 ml 带螺旋盖的缸内，

用 100%乙醇浸泡，室温下储存，直至使用。

4. 将双面胶带剪成 25mm×5mm 长条，然后将两条胶带边对边地粘贴在载玻片的中心，间隔 3 mm，使胶带与载玻片长轴平行。
5. 用 Dumont No. 5 镊子从储存缸中取一张清洁盖玻片，用 Kimwipe 轻敷盖玻片边缘，以除去乙醇液滴，然后将其迅速通过煤气灯的火焰，使乙醇蒸发。
6. 将盖玻片放于载玻片中心的胶带条上，然后用镊子背用力压盖玻片，使其与胶带条充分黏合。重复进行，直至准备好约 20 个灌流室。将灌流室保存于载玻片储藏盒中，直至使用。

支持方案 2　海胆精子轴丝的制备

材料（带√项见附录 1）

4 只雄性 *S. purpuratus* 海胆（Marinus）
0.55 mol/L KCl
人工海水（可由水族馆供应；按生产厂家的操作说明制备）
用蒸馏水配制的 20%蔗糖（w/v）
√分离缓冲液
√高盐缓冲液
√含有 50%甘油的分离缓冲液
带有 18G 针头的 60 ml 注射器
临床诊断用台式离心机
带有 Sorvall SS-34 型转子（或类似产品）的低温超速离心机（Sorvall RC-5B）
50 ml 多聚碳酸盐离心管（如 Sorvall）
具有 A、B 两型研棒的 50 ml Dounce 玻璃匀浆器

1. 将 4 只雄性海胆处死。用 60 ml 注射器抽取 0.55mol/L KCl，然后安上 18 G 针头。从每只海胆腹侧中心刺穿，将针插入约 1in，然后用液体注射体腔，直至有阻力感。将动物直立，放在纸巾上。几分钟后，配子开始从海胆背部的 5 个孔流出。

   由于在配子从背侧面上的 5 个孔流出前不可能知道海胆的性别，因此至少要定购实验所需量两倍的动物。

2. 当精子流出时，用带有橡胶球的玻璃 Pasteur 吸管收集白色精液。将 4 只动物获取的精子（3～4 ml）集中放在冰上的试管中，然后用 3 倍容量的人工海水将精子稀释，在冰上放置 20 min。
3. 用临床诊断台式离心机离心，500r/min，5min，使碎片形成沉淀。将上清液移入 50 ml 多聚碳酸盐离心管，在 4℃条件下离心，3000*g*，5 min，使精子沉淀。
4. 将上清液取出并丢弃，加入 5 倍体积的 20%蔗糖，通过研磨将精子沉淀混悬，然后通过渗透除去质膜。将去膜的精子移入 Dounce 玻璃匀浆器（部分埋于碎冰中），将研棒从液体顶部伸至最底部，然后返回，但不要破坏液面，由此用 B 型研棒快速匀浆 15 次，使精子头部与尾部断离。

5. 将匀浆移入 50 ml 离心管中，在 4℃条件下离心（12 000g，10min），使精子头沉淀。将含有去膜精子尾的上清液收集到新的 50 ml 离心管中，在 4℃ 条件下离心（20 000g，15min），使精子尾沉淀。
6. 弃去上清液，用金属称量勺和 Pasteur 吸管只将沉淀顶部含有去膜精子尾的白色层收集起来。然后，通过研磨用 4 倍体积的分离缓冲液混悬收集的精子尾（顶部的白色层，避免取到底部的黄色层）。
7. 将混悬的精子尾移入置于冰上的 Dounce 玻璃匀浆器，用 A 型研棒快速匀浆 5 次，使精子尾断裂成片段。将精子尾片段混悬液移入 50 ml 离心管，在 4℃条件下离心（12 000g，10min），使 50 ml 离心管中的精子尾片段形成沉淀。
8. 弃去上清液，仅收集沉淀顶部的白色层。用 4 倍体积的分离缓冲液将白色沉淀混悬，将混悬液移入新的离心管中，按步骤 7 离心。然后，重复此混悬和离心步骤 1 或 2 次以上，以便将精子尾片段与精子头和精子碎片完全分离，直至沉淀形成纯白的单层。
9. 弃去上清液，用 4 倍体积的高盐缓冲液混悬白色沉淀，再移入放在冰上的 Dounce 玻璃匀浆器中，用 A 型研棒匀浆 5 次，在冰上孵育 45 min，以便从精子尾片段中提取动力蛋白和成对的中央微管。
10. 将提取物混悬液移入 50 ml 离心管中，在 4℃条件下离心（20 000g，15min），以从可溶性蛋白质中分离出提取的轴丝。弃去上清液，通过研磨用 4 倍体积的高盐缓冲液混悬轴丝沉淀。然后，将轴丝悬液移入新的 50 ml 离心管中，在冰上孵育 15 min，提取轴丝片段。
11. 在 4℃条件下离心（20 000g，15 min），使提取的轴丝形成沉淀。弃去上清液，通过研磨用 1/3 原精子容量（步骤 2）的分离缓冲液和 50%甘油的混合液混悬提取的轴丝沉淀。
12. 按 20 μl 的等分量将轴丝分装入 0.5 ml 微量离心管中，然后将离心管放入液氮中冷冻。将冷冻的轴丝在－70℃条件下储存，直至使用。
13. 为了应用于微管/细胞器运动实验，需确定合适的轴丝稀释度。将 1 个等分量的轴丝融化，然后在简单灌流室（见支持方案 1）中用 VE-DIC（按实验中使用的同样放大倍数）观察不同的稀释度。注意所需的稀释度约为每 30 μm^2 显微视野可观察到 2 或 3 条轴丝。

支持方案 3　猪脑微管蛋白的制备

材料（带√项见附录 1）

100 g P-11 磷酸纤维素纤维性阳离子交换器（Whatman）
0.1mol/L HCl
0.1mol/L 和 10mol/L NaOH
0.1mol/L $MgSO_4$
√10×和 1×色谱柱缓冲液
3 个新鲜的猪脑（在处死后 3h 内使用）

√匀浆缓冲液（使用前配制）
√PM 缓冲液
√100 mmol/L MgATP
√PMG 缓冲液
√100 mmol/L MgGTP
√1mol/L 二硫苏糖醇（DTT）
谷氨酸钠
2L 泉华玻璃过滤漏斗和 2 L 带有侧管的 Erlenmeyer 烧瓶
Waring 搅拌器
装有 Beckman 50.2Ti 转子（或类似产品）的温控超速离心机（Beckman L7-55）
带有橡胶盖的 31.5 ml 多聚碳酸盐厚壁超速离心管（如 Beckman）
30 ml Dounce A 型玻璃匀浆器
44mm×250mm 可调容量的低压液相色谱柱（如 Amicon 95240 型或类似产品）

1. 在 4 L 烧杯中加入 2 L 0.1mol/L NaOH，一边用玻棒轻轻搅拌，一边加入 90 g Whatman P-11 磷酸纤维素。将混悬液轻轻混合 5 min 后，使固体沉降 20 min。吸取并丢弃多余的溶液，然后将剩余的磷酸纤维素混悬液移入 2 L 泉华玻璃漏斗中，该漏斗放在带有侧管的 Erlenmeyer 烧瓶上，侧管与真空管相连。通过真空过滤将 0.1mol/L NaOH 从磷酸纤维素中小心地滤出，但不能使磷酸纤维素树脂干燥。
2. 从漏斗上轻轻刮取磷酸纤维素，将其放回到 4 L 烧杯中。然后加入 2 L 0.1mol/L NaOH，轻轻混合 5 min，用 pH 试纸测混悬液的 pH。如果混悬液的 pH 不大于 12.0，重复沉降、吸取、过滤处理和用 2 L 0.1mol/L NaOH 混悬磷酸纤维素。如此反复进行，直至 pH>12.0。
3. 通过真空过滤用 4 L 蒸馏水浸洗磷酸纤维素，应小心操作，决不能使树脂干燥。
4. 将磷酸纤维素从漏斗移入 4 L 烧杯中，然后加入 2 L 0.1mol/L HCl，轻轻混合，使树脂沉降，吸去多余的溶液，真空过滤树脂（如同步骤 1）。重复 0.1mol/L HCl 处理过程，直至磷酸纤维素混悬液的 pH<3.0。
5. 通过真空过滤用 4 L 蒸馏水浸洗磷酸纤维素。
6. 将磷酸纤维素树脂移入 4 L 烧杯中，加入 2 L 0.1mol/L $MgSO_4$，然后混合、静置、吸去溶液和真空过滤。
7. 将磷酸纤维素树脂移入 4 L 烧杯中，加入 2 L 10×色谱柱缓冲液，轻轻混合 10～15 min，使树脂沉降，吸去多余的缓冲液，然后真空过滤。
8. 将树脂移入 4 L 烧杯中，加入 2 L 1×色谱柱缓冲液，轻轻混合 5 min，用 pH 计测混悬液的 pH，再用 10 mol/L NaOH 调整 pH 至 6.6。让树脂沉降，吸去多余的缓冲液，然后真空过滤。重复 1×色谱柱缓冲液处理过程，用 10mol/L NaOH 调整混悬液的 pH 至 6.6，直至在悬浮和混合后不需调整混悬液 pH 也达到 6.6。让树脂沉降 20 min，吸去缓冲液，直至沉降的树脂与缓冲液的比率为 3∶1（v/v）。
9. 将树脂轻轻混合，直至均匀混悬于缓冲液中。然后，将混悬液迅速注入空的44mm×250mm 液相色谱柱中，在冷室内将色谱柱夹在支架上。将混悬液充满至色谱柱顶

部，然后用石蜡封闭，让树脂沉降数小时。

10. 用色谱柱缓冲液充满色谱柱的调节活塞，然后慢慢地将其插入色谱柱中，要特别小心，不要搅动磷酸纤维素树脂。继续向下插入调节活塞，直至所有气泡经色谱柱的输入管从柱中排出。色谱柱的输入管浸没在 4 L 的色谱柱缓冲液储器中。将色谱柱的调节活塞装置压紧，用封条密封，将色谱柱的输入管留于缓冲液储器中。
11. 将色谱柱的输出管与蠕动泵相连，调整蠕动泵，以 0.25 ml/min 流速运行，装柱约 48 h。
12. 将脑放入抽空并带有拉链的塑料袋内，再将其埋于冰中，从屠宰场转移到实验室。
13. 在 4℃冷室内操作，从脑表面、脑干和脑沟处仔细彻底地除去脑膜和出血组织。用手除去出血组织，再用 Kimwipes 纸巾剥除脑膜。
14. 将干净的脑组织切成 2～3 cm^2 小块，称重后将脑组织块移入 Waring 搅拌器中，按 0.5 ml/g 加入现配制的含有 1 mmol/L MgATP 的匀浆缓冲液。
15. 高速搅拌 5s，再低速搅拌 45s，将组织匀浆。用强吸力吸球和切去尖端 1/3 的 50 ml 血清吸管，将脑组织匀浆移入几支 31.5 ml 多聚碳酸盐超速离心管中。注意匀浆的容量，配平每对管（至 0.01 g）。丢弃多余的匀浆。为从细胞溶胶中除去未被破坏的组织，在 4℃条件下将匀浆离心（100 000*g*，60min）。
16. 在室温下操作，用吸管小心地从离心管中收集细胞溶胶上清液。将上清液集中于有刻度的圆筒中，然后加入等量的 PMG。为促进微管聚合，加入 MgGTP 至 0.2mmol/L，然后分装入 31.5 ml 超速离心管中，配平每对管。将离心管中含有细胞溶胶的部分浸入 37℃水浴中，孵育 45 min，使微管蛋白聚合成微管。在此孵育过程中，将超速离心机和 50.2Ti 转子预温至 25℃。
17. 在 25℃条件下离心（100 000*g*，45 min），使细胞溶胶中的微管沉降下来。在冷室内弃去上清液，然后以等同于匀浆容量 1/5 的含有 0.2 mmol/L GTP 的 PM 缓冲液混悬微管沉淀。
18. 用圆头称量勺刮出黏性沉淀物，将其移入 Dounce 匀浆器中。通过研磨将残留在超速离心管中的沉淀混悬，然后移入匀浆器中。用 A 棒匀浆 5～10 次。将混悬的微管分装入 31.5 ml 超速离心管中，配平每对管。将混悬的微管在冰上孵育 30 min，每 5 min 轻轻混合 1 次，使微管解聚。在此孵育过程中，将超速离心机和转子预冷至 4℃。
19. 在 4℃条件下离心（100 000*g*，45 min），使微管蛋白透明。然后，在室温下收集含有微管蛋白的上清液，加入等量 PMG，同时将 GTP 加至 0.2 mmol/L 浓度。分装入 31.5 ml 超速离心管中，配平每对管。
20. 将离心管含有微管蛋白溶液的部分浸入 37℃水浴中，孵育 45 min，使微管蛋白聚合。在此孵育过程中，将超速离心机和转子预温至 25℃。
21. 在 25℃条件下离心（100 000*g*，45 min），使微管从未能聚合的微管蛋白中沉降下来。在冷室内弃去上清液，在每支离心管中加入 1 ml 含 0.5 mmol/L GTP 的色谱柱缓冲液，确认缓冲液覆盖沉淀。将离心管浸入液氮中，使沉淀冻结。然后，将离心管储存于－70℃至第二天或至用磷酸纤维素柱纯化微管蛋白时。
22. 将超速离心机和 50.2Ti 转子预冷至 4℃。

23. 用含 0.5 mmol/L GTP 和 1 mmol/L DTT 的色谱柱缓冲液准备和平衡磷酸纤维素柱。关闭蠕动泵。如果树脂床已制备成功，小心地松开调节活塞上的封条。将调节活塞缓慢地进一步插入柱内，直至恰好接触树脂顶部，然后将封条封紧。将色谱柱的输入管从盛有 1×柱缓冲液的储器转换到含有 0.5 mmol/L MgGTP 和 1 mmol/L DTT 的 1×色谱柱缓冲液的 1 L 储器中。注意不要将泡沫引入输入管内。打开蠕动泵，将速度调至 1.8 ml/min。通过色谱柱至少吸取 300 ml 缓冲液后，再加入微管蛋白。
24. 在磷酸纤维素柱平衡过程中，将含有微管沉淀的超速离心管取出（从步骤 21），浸入 37℃水浴中，直至沉淀由白垩白转变为完全透明的白色。当沉淀融化时，立即将离心管放在冰上，并放置于冷室内。
25. 加入沉淀体积约 3 倍容量的含有 0.2 mmol/L GTP 的 1×色谱柱缓冲液，用 Dounce 玻璃匀浆器和 A 型棒在冰上将沉淀混悬，再将混悬的微管移入 31.5 ml 超速离心管中，在冰上孵育 30 min，每 5 min 轻轻混合 1 次，使微管去聚合。
26. 在 4℃条件下离心（100 000g，45min），使微管蛋白纯化，然后在冷室内收集纯化的微管蛋白上清液，加入 MgGTP 至 0.5 mmol/L 终浓度（添加 0.3 mmol/L），并加入 DTT 至 1mmol/L 终浓度。
27. 当磷酸纤维素柱达到平衡时，将输入管从缓冲液储器转移至纯化的微管蛋白中，按 1.8 ml/min 的速度将微管蛋白装入色谱柱。当微管蛋白装入结束时，将输入管转换到缓冲液储器中，然后开始以 10 ml 分量收集。当每个等分量收集完成时，加入 MgGTP 至 1mmol/L 终浓度（添加 0.5 mmol/L）。

    微管蛋白将通过色谱柱流出，约流出 100 ml。微管结合蛋白将保持与磷酸纤维素树脂结合。
28. 利用 UV 监视器测量 280 nm 的吸光度值，以检测微管蛋白的洗脱。收集含有微管蛋白的各个分量（通常约为 100 ml）。
29. 在室温下操作，将谷氨酸钠按 0.186g/ml 加入微管蛋白溶液中，慢慢搅动，直至溶解。将溶液分装入 31.5 ml 超速离心管，配平每对管。将离心管放入 37℃水浴，使离心管的液面与水浴的液面一致，孵育 30 min，使微管聚合。在此期间，将超速离心机和转子预温至 25℃。
30. 在 25℃条件下离心（100 000g，30 min），使微管与未能完全聚合的微管蛋白分离。然后，在冷室内用 Dounce 玻璃匀浆器在冰上以 3 倍容量的含有 0.5 mmol/L MgGTP的 PM 缓冲液混悬微管沉淀。然后，在冰上将混悬的微管孵育 30 min，使微管解聚。
31. 在此期间，测量 280 nm 的吸光度值，确定微管蛋白的浓度（用含有 0.5 mmol/L MgGTP 的 PM 缓冲液作为空白对照）。用下列公式计算微管蛋白的浓度：[微管蛋白]=(A_{280}×稀释倍数）/消光系数，微管蛋白的消光系数=115 000 mol/cm。加入含有 0.5 mmol/L MgGTP 的 PM 缓冲液，将最终的蛋白浓度调至 45 μmol/L。
32. 分装成几个 1 ml 等分量（储存等分量）和几个 50 μl 等分量（在微管/细胞器运动实验中直接使用的分量），浸入液氮中冷冻，在－70℃条件下储存，直至需要。

    3 个猪脑应该产出约 60 g 纯的微管蛋白。

支持方案 4　大鼠肝细胞溶胶的制备

材料（带√项见附录 1）

新鲜或瞬间冷冻的大鼠肝（Pel-Freez）

√PBS

√匀浆缓冲液

含有 0.5 mmol/L MgGTP 的匀浆缓冲液（由 100 mmol/L MgGTP 储备液配制，见配方）

√含有 0.25mol/L 蔗糖的 PM 缓冲液

装有 Sorvall SS-34 型转子（或类似产品）的超高速离心机（Sorvall RC-5B）

装有 Beckman 50.2Ti 和 SW-28 转子（或类似产品）的超速离心机（Beckman L7-55）

带有 Teflon 棒的 20 ml 玻璃匀浆器

匀浆器或钻机

50 ml 多聚碳酸盐离心管（如 Sorvall）

带有橡胶盖的 31.5 ml 多聚碳酸盐厚壁超速离心管（如 Beckman）

1. 将超高速离心机、超速离心机和转子预冷至 4℃。
2. 在冷室内，用 PBS 将肝充分清洗，再用现配制的匀浆缓冲液清洗。将肝称重后，放回冷室，用剪刀将组织剪碎。将剪碎的组织移入 20 ml 玻璃匀浆器，加入 1 倍容量的含有 0.5 mmol/L MgGTP 的匀浆缓冲液。将匀浆器埋入碎冰中，用连于匀浆器或钻机上的 Teflon 棒缓慢插入组织 6 次，使组织匀浆，转速为 3000r/min。
3. 将组织匀浆移入 50 ml 离心管，配平每对管。然后在 4℃条件下离心（10 000*g*，10 min），以除去细胞碎片。
4. 在冷室内收集上清液，将上清液移入 31.5 ml 超速离心管，配平每对管。在 4℃条件下离心（100 000*g*，60 min），以纯化细胞溶胶。收集纯化的细胞溶胶上清液，分装为 50 μl 等分量，浸入液氮中冷冻。在－70℃条件下储存，直至使用。

这个方案可获得足够的细胞溶胶，可满足 200 次微管/细胞器运动实验。

支持方案 5　大鼠肝细胞器组分的制备

附加材料（同见支持方案 4；带√项见附录 1）

√含有 0.5 mmol/L MgGTP（由 100 mmol/L MgGTP 储备液配制，见配方）和 0.25mol/L 蔗糖的匀浆缓冲液

√含有 0.5 mmol/L MgGTP 的匀浆缓冲液

2.3mol/L 蔗糖

√含有 0.25mol/L 蔗糖和 0.5 mmol/L GTP 的 PM 缓冲液

3mol/L KI 储备液（任选的）

√0.5mol/L EDTA 储备液（任选的）

0.5mol/L Na_2CO_3 储备液，pH 11.5（任选的）

√含有 0.25mol/L 蔗糖的 PM 缓冲液（任选的）

25 ml 超净超速离心管（如 Beckman）

Beckman SW-28 和 50.2Ti 转子或类似产品

带有橡胶盖的 31.5 ml 多聚碳酸盐厚壁超速离心管（如 Beckman）

TLA 台式超速离心机（Beckman），装有 TLS-55 多形桶转子或类似产品以及微量超速离心管（如 Beckman）

1. 将肝清洗、切碎和初步离心，如同鼠肝细胞溶胶的制备（见支持方案 4，步骤 1～3），但步骤 2 除外，用含有 0.5 mmol/L MgGTP 和 0.25mol/L 蔗糖的匀浆缓冲液将切碎的肝组织匀浆。
2. 在冷室内，从澄清的匀浆中收集上清液，加入 2.3mol/L 蔗糖至 1.25mol/L 终浓度。
3. 按下列方法在 25ml 超净超速离心管内配制蔗糖密度梯度：用含有 0.5mmol/L MgGTP的匀浆缓冲液稀释 2.3mol/L 蔗糖储备液，以制备 2.0、1.25、1.1 和 0.25mol/L 蔗糖溶液，预冷至 4℃。将 2 ml 2.0mol/L 的蔗糖注于管底。注意避免搅动下面的蔗糖层，在 2.0mol/L 蔗糖上面用滴管加入 12 ml 含有 1.25mol/L 蔗糖的澄清匀浆，使溶液沿离心管壁均速缓慢流下。然后加入 12 ml 1.1mol/L 蔗糖，再加入 8 ml 0.25mol/L 蔗糖。丢弃多余的匀浆。用相等重量的平衡管将梯度管配对。
4. 在 4℃条件下进行密度梯度离心（100 000g，3h），以分离细胞器。在冷室内操作，用 Pasteur 吸管仔细吸取位于 0.25mol/L 蔗糖层和 1.1mol/L 蔗糖层之间界面处的高尔基膜白色带以及位于 1.1mol/L 蔗糖层和 1.25mol/L 蔗糖层之间界面处的内质网膜白色带。然后，将每种细胞器组分分别放入置于冰上的 31.5 ml 超速离心管。
5. 确定高尔基膜和内质网膜组分的蛋白浓度（附录 3A 和 3B）。
6. 以 3 倍体积用含有 0.5 mmol/L MgGTP 的匀浆缓冲液配制的 0.25mol/L 蔗糖稀释两种膜组分。在 4℃条件下离心（100 000g，60 min），使膜形成沉淀。
7. 在冷室内，弃去上清液，通过充分研磨分别用含有 0.25mol/L 蔗糖和 0.5mmol/L GTP 的 PM 缓冲液混悬致密而黏稠的内质网膜和高尔基膜沉淀，达到 5 mg/ml 的蛋白浓度。分装成 20μl 等分量，浸入液氮中冷冻。在－70℃条件下储存，直至使用。
8. 为了确定在运动实验中使用的内质网膜和高尔基膜的合适稀释度，在简单灌流室中用 VE-DIC 显微镜观察由 PM 缓冲液调配的几种膜稀释液。注意需要稀释为细胞器覆盖显微视野约 20%。
9. 在微管运动实验前制备膜时，将在步骤 7 冻存的 1 个分量解冻，按步骤 8 的方法制成 6×稀释度的膜储备液。
10. 可选择此步骤。为了分离膜，用下列一种溶液将分离的细胞器（50～100μl）在冰上孵育 30 min。

    盐洗的细胞器：0.6mol/L KI（用 3mol/L KI 储备液配制）；

    EDTA 分离的细胞器：10mmol/L EDTA（用 0.5mol/L EDTA 储备液配制）；

    酸洗的细胞器：150mmol/L Na_2CO_3（用 0.5mol/L Na_2CO_3 储备液配制，pH

11.5)。

11. 将孵育的细胞器移入微量超速离心管中，在4℃条件下用Beckman TLA台式超速离心机离心（110 000*g*，1 h），使膜形成沉淀。
12. 小心地吸去上清液，通过轻轻研磨按原有容量用含有0.25mol/L蔗糖的PM缓冲液混悬膜沉淀。
13. 用布雷菲德菌素A、氟化铝或GTP-γ-S孵育膜、细胞溶胶和能量混合物（37℃，30 min）后，将该试剂加入膜混合物（见表15.1.1）。按步骤11离心，分离处理后的膜。然后混悬膜组分，按叙述方法应用。

这个方案可获得足够的细胞器，可满足200次微管/细胞器运动实验。

参考文献：Coue et al.,1991；Dabora and Sheetz，1988；Klausner et al.,1992；Salmon and Tram，1998；Vale and Hotani，1988；Waterman-Storer et al.,1995

撰稿人：Clare M. Waterman-Storer

单元15.2　肌动蛋白通过肌球蛋白移动的体外运动实验

制备肌球蛋白的方法主要取决于所研究的肌球蛋白的类型（见表15.2.1）。

表15.2.1　肌球蛋白纯化方案

肌球蛋白类型	纯化方案
兔骨骼肌肌球蛋白	Margossian and Lowey，1982。酶方法学85B：55
无脊椎动物的横纹肌肌球蛋白	Sellers，1981。JBC 256：9274
鸡平滑肌	Sellers et al.,1981。JBC 256：13137
非肌肌球蛋白Ⅱ	Daniel and Sellers，1992。酶方法学215：76
土人粗肌丝	Sellers and Kachar，1990。Science 249：406
肌球蛋白Ⅰ	Collins et al.,1990。JBC 110：1137
肌球蛋白Ⅴ	Nascimento et al.,1996。JBC 271：17561
杆状病毒/*Sf*9表达的重组肌球蛋白[a]	Trybus，1994。JBC 269：20819

a. 如果该重组肌球蛋白由HIS或FLAG标记，在纯化中可以使用特异性亲合柱。

基本方案　分析肌动蛋白通过肌球蛋白的移动

材料（带√项见附录1）

0.2 mg/ml肌球蛋白单体（见表15.2.1）

√用G肌动蛋白缓冲液配制的1 mg/ml BSA

√清洗缓冲液

含有1 mmol/L ATP和5 μmol/L肌动蛋白的清洗缓冲液（见支持方案2）

含有20 nmol/L罗丹明鬼笔环肽标记的肌动蛋白的清洗缓冲液（见支持方案3）

√实验缓冲液

灌流室（见支持方案1）

荧光显微镜，装有高倍物镜（60×～100×，1.3～1.4NA）和100 W汞灯。
SIT摄像机或增强的CCD
VHS或sVHS录像机
图像处理器
细胞捕获图像分析系统（运动分析）

1. 将0.2 mg/ml肌球蛋白单体（或可溶性片段HMM和S1）注入灌流室，让溶液在灌流室内存留2 min，使肌球蛋白结合。

   肌球蛋白单体应用于高离子浓度缓冲液（例如，用0.5mol/L NaCl、pH7.0的10 mmol/L MOPS、0.1 mmol/L EGTA和1 mmol/L DTT配成的缓冲液），而HMM或S1可用于低离子浓度缓冲液（例如，用pH7.0的10 mmol/L MOPS、0.1 mmol/L EGTA和1 mmol/L DTT配成的缓冲液）。肌球蛋白微丝需用于低离子浓度缓冲液，如50 mmol/L KCl、pH7.0的10 mmol/L MOPS、1 mmol/L MgCl、0.1 mmol/L EGTA和1 mmol/L DTT的缓冲液。在低离子浓度缓冲液中，肌球蛋白微丝是稳定的。

   最好用新鲜制备的肌球蛋白进行此实验，尽管也可用快速冻存并储存于液氮中的肌球蛋白。

2. 用2～3倍体积由肌动蛋白缓冲液配制的1 mg/ml BSA洗灌流室，让最后1倍体积的缓冲液在灌流室中保留1～2 min，以洗去未结合的肌球蛋白和阻断非特异性结合。
3. 用2～3倍体积含有1 mmol/L ATP和5 μmol/L肌动蛋白的清洗缓冲液洗灌流室（使用前，将溶液剧烈搅动或用细注射器反复抽注，以防止未标记的肌动蛋白容易附着于盖玻片表面）。使最后1倍体积的缓冲液在灌流室内保留1～2 min。

   当有头部损伤的肌球蛋白存在时，它们虽然能与肌动蛋白结合，但不能水解ATP，导致运动能力较差。有两种方法可以使此现象减小到最低程度。使用罗丹明鬼笔环肽标记的肌动蛋白前，在ATP存在的条件下可用含未标记肌动蛋白的溶液清洗覆盖有肌球蛋白的盖玻片，使损伤的肌球蛋白头部与未标记的肌动蛋白形成复合物。如果这种简单处理效果不佳，可在高离子浓度和ATP存在的条件下将化学计量的F肌动蛋白加入肌球蛋白中，然后用Beckman TL 100超速离心机离心，480 000*g*，15 min，使肌球蛋白样品覆盖于盖玻片之前，除去头部损伤的肌球蛋白。

4. 用2～3倍体积的清洗缓冲液洗灌流室，以除去ATP，再用2倍体积含有20nmol/L罗丹明鬼笔环肽标记的肌动蛋白的清洗缓冲液处理，使其与盖玻片上的肌球蛋白结合0.5～1 min。
5. 加入实验缓冲液，开始进行运动实验。甲基纤维素使缓冲液变得黏稠，故可将小片滤纸放在灌流室的流出处，以此将溶液引入灌流室。
6. 将灌流室放在显微镜载物台上，用检测罗丹明荧光的滤光片和高倍物镜（NA 60×～100×）观察罗丹明鬼笔环肽标记的肌动蛋白的移动。由肌球蛋白引起的肌动蛋白移动取决于温度，故应将载玻片的温度调至25～30℃。可在适当位置放一台吹风机，以便提供所需温度，也可利用水夹层或用Peltier型装置将物镜罩起。通过固定在盖玻片和载玻片之间的细线电热调节器估计小室内样品的温度。将此灌流室模

型固定在载物台上，然后将物镜调至使灌流室成像时所需位置。

7. 如果附着于肌动蛋白微丝上的罗丹明标记物迅速褪色，可用中等密度滤光片降低光强度，并通过图像平衡增加信号与噪音的比率。检测体外运动实验中的氧清除成分（葡萄糖氧化酶和过氧化氢酶），以保证这些酶具有活性。如果已经没有活性，可使用 50 mmol/L DTT。
8. 如果肌动蛋白微丝出现间歇移动或迅速地被剪切成小片，可降低盖玻片表面的肌球蛋白密度。在肌球蛋白制备液中含有僵直样非可逆性的头部损伤的肌球蛋白时，此现象是典型的。如果需要，制备新鲜的肌球蛋白。
9. 如果肌动蛋白微丝与盖玻片表面分离或出现摆动，增加附着于盖玻片表面的肌球蛋白密度或降低离子浓度。一般来讲，甲基纤维素通过降低肌动蛋白微丝的 Brownian 移动引起肌动蛋白微丝在低表面密度肌球蛋白上的移动。存在甲基纤维素时，Brownian 移动只发生在肌动蛋白微丝的长径上。
10. 用增强 CCD（charge-coupled device）、neuvicon 摄像机或 SIT（silicon-intensified target）摄像机和 sVHS 录像机处理结果，其中用摄像机观察图像，用录像机记录图像移动。这些图像移动可在标准的黑白图像显示器上显示。

    因此，实验的各种参数必需相应变化。对于缓慢移动的肌球蛋白（$<0.2\mu m/s$），需要较长的成像间隔，较低的照明强度。结果，平均 16～64 幅图像对改善信噪比是非常有用的。对于快速移动的肌球蛋白（4～10 $\mu m/s$），可使用较短的成像间隔与较高的照明强度。在这些条件下，应有增强 CCD 摄像机，以对抗 SIT 摄像机。SIT 摄像机的反应时间较慢，可引起出现彗星样尾部的肌动蛋白微丝图像。
11. 如果肌动蛋白微丝太暗淡，可增加光强度或平均的图像数。去掉位于肌动蛋白微丝与摄像机之间的任何不需要的玻璃。如果需要，制备新鲜的肌动蛋白。
12. 利用自动追踪系统如细胞追踪系统，超时测量肌动蛋白微丝的位置，对每条肌动蛋白微丝测量 5～10 个时间点，从而对结果进行定量分析。计算和记录测量的平均速度。

支持方案 1　灌流室的制备

材料

用乙酸戊酯配制的 1%硝化纤维（w/v，Ernest F. Fullham）
爱皮松 M 油脂（Thomas；任选的）
双面胶带
18 mm^2 No. 1 盖玻片
玻璃载玻片
24mm×60mm No. 0 盖玻片（任选的）

1. 将 2 μl 乙酸戊酯配制的 1%硝化纤维滴加在 No. 1 盖玻片上，用吸管将液滴在盖玻片表面涂开，然后晾干（5 min）。
2. 将两条平行的双面胶带粘贴在载玻片上，间隔约 10 mm。在胶带上面，放置硝化纤

维预涂的盖玻片，涂面向下，制成一个简单的灌流室。

支持方案 2　肌动蛋白的纯化

注意：所有使用活动物的实验方案，必须经过研究机构动物保护与使用委员会(IACUC) 的预先审查和批准，或者必须遵守政府有关实验动物保护与使用的规定。

除其他特殊情况外，所有操作步骤都在 4℃条件下进行，所有的缓冲液应事先预冷至此温度。

材料（带√项见附录 1）

刚处死的 350 g 兔的背部和腿部肌肉
0.1mol/L KCl 和 0.15mol/L 磷酸钾的混合液，pH 6.5
0.05mol/L $NaHCO_3$
1 mmol/L EDTA，pH 7.0
丙酮
√G 肌动蛋白缓冲液
2mol/L KCl（储备液）
1mol/L $MgCl_2$（储备液）
绞肉机，预冷
纱布
滤纸
Sorvall 离心机和 SS-34 转子（或类似产品）
Beckman 超速离心机和 55 Ti 转子（或类似产品）
Potter-Elvehjem 组织匀浆器

1. 从刚处死的兔切取背部和腿部肌肉，用蒸馏水洗去血液，然后放在冰上预冷。
2. 用已预冷的绞肉机将肌肉磨碎。用 1 L 0.1mol/L KCl 和 0.15mol/L 磷酸钾的混合液 (pH 6.5) 提取肉末 10 min 同时用玻棒搅拌。然后，在固定于环形架上的大漏斗内放数层纱布，通过挤压使肉末过滤。
3. 用 2L 0.05mol/L $NaHCO_3$ 提取剩余的肉末，玻棒搅拌精确至 10min。按步骤 2 过滤。
4. 用 1L 1mmol/L EDTA (pH 7.0) 提取过滤得到的肉末，搅拌 10min。然后，用 2 L 蒸馏水提取肉末两次，每次 5 min。
5. 在室温条件下用预冷的丙酮提取肉末 5 次，每次 10 min。然后，通过搅拌将残留的小块弄碎，过滤提取液。
6. 将丙酮清洗过滤的残渣铺在一张大的滤纸上面，在排气罩内干燥过夜。得到的丙酮粉末在－20℃条件下可储存数月。
7. 在冰上用 G 肌动蛋白缓冲液提取丙酮粉末（常用 5 g)，每克粉末用 20 ml 缓冲液，搅拌 30 min。

8. 按步骤 2 将提取液用纱布过滤，保留过滤液。用 G 肌动蛋白缓冲液重复提取残渣，每克初始干燥丙酮粉末使用 20 ml 缓冲液，搅拌 10 min。
9. 再用纱布过滤，保留过滤液。将过滤液合并，在 4℃条件下离心，40 000g，1h。小心倒出上清液，丢弃沉淀。
10. 加入 KCl 至 50mmol/L，并加入 $MgCl_2$ 至 2mmol/L，使肌动蛋白聚合。在冰上让肌动蛋白继续聚合 2 h。
11. 慢慢加入固体 KCl 至终浓度为 0.8mol/L，轻轻搅拌 30 min，以除去原肌球蛋白和 α-辅肌动蛋白。
12. 在 4℃条件下离心，150 000g，1.5h，使聚合的肌动蛋白形成沉淀。按每克丙酮粉末加入 3 ml G 肌动蛋白缓冲液，在覆有 Teflon 的匀浆器中匀浆，使 F 肌动蛋白沉淀重悬。
13. 对 G 肌动蛋白缓冲液反复透析 2 天，使肌动蛋白解聚。然后，在 4℃条件下将解聚的肌动蛋白离心，150 000g，1.5h。保留上清液。
14. 分别加入 KCl 和 $MgCl_2$ 至 50mmol/L 和 2mmol/L，使肌动蛋白聚合。选择含有1～2 mmol/L $MgCl_2$ 的缓冲液进行透析，以维持肌动蛋白的聚合状态。按 100～200μmol/L 的浓度在冰中储存约 1 个月。

支持方案 3　罗丹明鬼笔环肽标记的肌动蛋白的制备

材料（带√项见附录 1）

罗丹明鬼笔环肽（分子探针）
甲醇
√标记缓冲液
肌动蛋白（见支持方案 2，步骤 14）
√清洗缓冲液
Speed-Vap 蒸发器（Savant）或类似产品

1. 将 60 μl 罗丹明鬼笔环肽注入微量离心管，在蒸发器内干燥。用 5 μl 甲醇溶解干燥粉末，然后加入 85 μl 标记缓冲液。
2. 用标记缓冲液将肌动蛋白稀释至 20 μmol/L。然后，将 10 μl 20μmol/L 肌动蛋白加入含有罗丹明鬼笔环肽的微量离心管，孵育过夜。在冰中储存 1 个月。
3. 使用时用清洗缓冲液将 1 个分量稀释为 20 nmol/L 肌动蛋白。

参考文献：Margossian and Lowey，1982；Sellers and Kachar，1990；Umemoto and Sellers，1990

撰稿人：James R. Sellers

单元 15.3 植物细胞的细胞器运动：通过绿色荧光蛋白（GFP）使高尔基复合体和内质网的运动成像

目前，通过对野生型基因的遗传修饰获得了许多 GFP 变异体，通过优化改变了它们的各种特征。这种重新改造旨在改变 GFP 的光谱性质和增进生色团的成熟速度，包括 GFP 的光异构性和对光漂白的还原作用（Cubitt et al. 1995. 1999；单元 5.10）。因此，在开始大范围的转化步骤之前，建议对所用的 GFP 进行仔细选择。例如，具有增强型蓝激发峰值的突变体可以降低 UV 激发光，对植物进行快速遮蔽，使 UV 灯不能通过。

基本方案 瞬时表达在树叶内质网和高尔基探针可视化方面的应用

警告：用可高压的废液容器处理前，所有用于培养和清洗细菌的溶液应该用合适的杀菌剂处理。所得的植物材料应根据生物危害和处理原则进行处理。

注意：对于土壤杆菌属的培养和处理需要无菌条件，但在烟叶的浸润和随后的植物培养过程中不需要无菌。所有与细菌接触的仪器应进行高压灭菌。

材料（带√项见附录 1）

具有多克隆位点和适合挑选标志的土壤杆菌属载体（如 pVKH18En6）
肿胀的土壤杆菌属（如 GV3101：：pMP90）
√含有合适抗生素的 YEB 培养液
5%次氯酸钠（v/v）或 1% Virkon（w/v，Amtec Int. Ltd.）
√浸润培养基（INM）
生长 4 周的温室植物烟草、*N. clevelandii* 和 *N. benthamiana*
振荡培养箱，28℃
1.5 ml 无菌微量离心管
分光光度计
1ml 一次性无针头塑料注射器
22～25℃温室，用于栽培植物
永久性标记笔
精制手术剪
载玻片和盖玻片（共聚焦显微镜使用的盖玻片厚度为 0 号）
电胶带或防水胶带
常规落射荧光显微镜、共焦激光扫描显微镜（最好选用）或类似显微镜，带有合适滤光片（如标准的 FITC 阻断滤光片）
共聚焦图像瞬时记录软件（Zeiss，Leica，Bio-Rad）

1. 利用常规分子生物学技术，将 GFP 嵌合体克隆到有合适筛选标志的相应载体（如 kan^r 和 amp^r），然后转化相应的土壤杆菌属菌株。
2. 从选择性的培养皿中选出 1 个土壤杆菌属克隆，接种 2～5 ml 含有合适抗生素的 YEB 培养液。将培养物放入振荡培养箱中，在 28℃条件下培养，至生长平台期（24～48 h）。
3. 将 1 ml 培养物移入 1.5 ml 无菌微量离心管中，4000r/min，离心 5min，使杆菌沉淀。将上清液弃于 5%次氯酸钠（v/v）或 1% Virkon（w/v）消毒液中。
4. 用 INM 洗杆菌沉淀两次，每次用 1ml。然后，4000r/min，离心 5min。用 INM 重悬，使 OD_{600} 达到 0.5～0.6 或更高，以增加表达水平。

   为了避免可能存在人工产物，确保在瞬时表达植物细胞中所检测到的 GFP 荧光不是来源于土壤杆菌属合成的蛋白质是很重要的。建议连续稀释菌株，以获得理想表达水平。

5. 在浸润前，用亮光从下向上照射植物，并寻找开放叶孔，以易于浸润。
6. 将 1 ml 一次性塑料注射器（不要使用针头）抵在叶面上，通过简单推注将细菌悬液注射到远离轴心处的植物叶片表皮上，在叶的另一面用带有手套的手指固定叶片，以支撑注射器抵触点的压力。观察液体经叶孔扩散入叶片，可见到叶片组织变黑。用永久性标记笔画出浸润区的边界。
7. 除了在 20～22℃可以使感染最佳化外，一般将植物放于温室，在正常生长条件下孵育 2～3 天。

8a. 用 UV 灯观察：2 天后，用手提式较长波长的 UV 灯检测叶片中的 GFP 荧光（用 UV 激发峰值估计 GFP 变异体）。

   对于荧光出现所需要的时间可能取决于叶片本身的构造。最有效的实验方法是：将土壤杆菌属细胞接种入叶片 2 天后，检测一个叶片的组织，以后每 4～6h 检测一次，以确定使用的每个叶片组织的最佳荧光表达时间。

8b. 用显微镜观察：2 天后，用精制手术剪剪取一段叶片组织，再用一滴水将其固定于载玻片上，然后盖上长的盖玻片，用电胶带或防水胶带条固定盖玻片的每一端。

9. 用常规落射荧光显微镜或共焦激光扫描显微镜（最好选用）和合适滤光片观察样本。

   对于标记内质网和高尔基复合体的结构，根据表达水平用共聚焦激光显微镜捕获图像时可能需要较高的激光能量。由于 GFP 对光漂白作用有相当的抵抗能力，故可应用 GFP。此外，为了获得令人满意的信噪比，或许需要较大的光孔。虽然该方法降低显微镜的共焦和图像的临界分辨率，但能帮助克服在图像捕获过程中由于细胞器运动所致的图像模糊的问题。

   用活植物材料观察时，常常遇到诸如叶绿素的自发荧光、细胞质快速流动或细胞器运动等特殊问题。可通过选择使用滤光装置和优化显微镜设置克服这些问题。

   某些图像问题的解决方法见表 15.3.1。

10. 此步骤可选择。为了获得内膜动力学的共聚焦图像，选择感兴趣的部位，将激光强度调至最大，然后选择较大的光孔，尽快用共聚焦图像瞬逝记录软件收集图像。

表 15.3.1 共焦激光显微镜下观察 GFP 标记的高尔基复合体和内质网图像的优化方法

问 题	解决方法	结 果
叶绿素自发荧光	用窄频带发射滤光片（如 515～525 nm），并用最大亮度和对比度	叶绿素荧光减少
因内质网和高尔基复合体运动引起的图像模糊	增加激光强度和/或增加光孔孔径，并用单层扫描或收集限定目的区域（ROI）的信息	可降低分辨率和达到共聚焦，能获得如电影显示那样的定时资料
GFP 信号较弱，通过改变亮度和对比度也未能获得补偿	增加激光强度和/或增加光孔孔径	GFP 信号增强，共焦和分辨率降低
GFP 荧光的光漂白	降低激光强度以及平均图像扫描数目和每 Z 扫描层数目	降低分辨率和光漂白损害

参考文献：Boevink et al.，1996，1998；Cubitt et al.，1995，1999；Haseloff et al.，1997；Nebenführ et al.，1999

撰稿人：Chris Hawes，Federica Brandizzil，Henri Batoko and lan Moore

单元 15.4 细胞核运动

为了获得在本方案中所用的卵，做这些实验需要熟悉如何处理欧洲蟾蜍。在单元 12.5 中叙述的处理欧洲蟾蜍的方法可用于产卵和制备有活性的细胞质提取物。进行这些实验还需要有相当深的显微镜专业知识，尤其是有关使用录像增强微分干涉差(VE-DIC)显微镜方面的专业知识。可参考单元 5.1 中基本的显微镜理论和技术。用 VE-DIC 记录微管和细胞器成像的特殊技术在别处（单元 15.1）介绍。

基本方案 细胞核运动实验

材料（带√项见附录 1）

中心体（见支持方案 1）
√PE 缓冲液
√用 PE 缓冲液配制的 5 mg/ml 酪蛋白
√ABC 缓冲液
HSS 细胞溶胶（见支持方案 4）
DNA 结合微珠的细胞核（见支持方案 5）
√在 37℃条件下的 Valap
浸渍油
实验试剂（如药物、抗体、表达蛋白）
包被于微珠上的抗体（用于免疫耗竭实验）
装有高分辨 DIC 光学系统的倒置显微镜
简单灌流室：清洁载玻片、双面胶带和干净的 18mm×18mm 盖玻片（制备方法见单元 15.1，支持方案 A1）
湿盒：周围有湿滤纸条围绕的带盖的 10cm 或 15cm 玻璃 petri 皿

磁珠浓缩器（Dynal）
倒置显微镜
摄像机（如 Hamamatsu CCD C307，Hamamatsu）
图像处理器（如 Argus 10、Hamamatsu 或类似产品）

1. 实验前将用于 DIC 微管成像的倒置显微镜调至最佳状态。
2. 按照单元 15.1 中支持方案 1 的说明制作灌流室（容量约 7μl），即将两条双面胶带粘贴在载玻片上，间隔 2mm，再将 18mm×18mm 盖玻片放在胶带上面。
3. 将 1 个等分量的中心体解冻，用 PE 缓冲液稀释至在支持方案 2 中确定的最适浓度。在实验当天用的每个灌流室中加入 7μl 稀释的中心体。小心不要将气泡引入灌流室内。将灌流室倒置于冰上，让中心体沉降至盖玻片上并黏附 5min。

   关于所有灌流步骤，在灌流室一端的开口处滴加样品，在对侧用一小片滤纸引流液体。

   所有实验细胞成分都可以分装成小的实验用等分在 −70℃ 单独储存至 6 个月，在实验过程中再将这些成分混合。在研究微管介导的细胞核运动方面，用分装的冷冻成分，不仅可纯化或修饰这些成分，以研究各个蛋白质的功能，而且有助于实验的重复。在使用最后几个分量之前，最好准备新的储备（中心体、细胞核、HSS）。可尝试每次只转换一种成分，然后与原来的一批并列观察该新分量的效果，以保证其真正地发挥作用。
4. 使 30 μl 用 PE 配制的 5 mg/ml 酪蛋白流经灌流室，以封闭中心体在玻璃表面上的结合点和洗去未附着的中心体。将灌流室在冰上孵育至使用（最长可达 4h）。

   从此步骤开始，由于每个灌流室必须在显微镜下观察，故每次将只能用一个灌流室。
5. 在实验开始前 10 min（见图 15.4.1），用 30μl ABC 缓冲液洗灌流室。然后，在灌流室内加入 10μl HSS 细胞溶胶，将灌流室放入湿盒，室温孵育 10 min，使中心粒周围物质从细胞溶胶析出、微管积聚和星体形成。
6. 在 10 min 孵育过程中，迅速将 1 个分量 DNA 结合微珠的细胞核解冻（见支持方案 5），立即放于冰上。用 150μl ABC 缓冲液重悬细胞核。用磁珠浓缩器回收，小心地弃去 ABC 缓冲液，然后用 10 ml HSS 细胞溶胶重悬。
7. 在灌流室内加入细胞核悬浮液，开始实验。用 Valap 封闭灌流室，将浸渍油涂于灌流室的顶部和底部，在 20～22℃ 用 DIC 光学系统、100× 物镜和高分辨率聚光镜观察。
8. 用照相机（合适的图像曝光间隔时间为 5s）记录细胞核的运动，收集记录图像。用 Argus 10 图像处理器或相同的图像处理程序平均连续的图像并减去背景。
9. 为了对中心体的积聚做定量分析，重复步骤 1～8。在加入 DNA 结合微珠的细胞核后 20 min 开始实验，并追加 10 min。尽可能计数多个视野，以确定中心体处细胞核的平均数（90%～95%），并与远离中心体（>5μm）处细胞核的平均数进行比较。

   由于许多细胞核含有复合的 DNA 结合微珠，每个含有微珠和细胞核的中心体应当计作为 1。因此，积聚的数量为最小限度值。<90%～95% 的积聚值提示难以用

于实验。如果该实验看来很好，继续进行下一步骤。

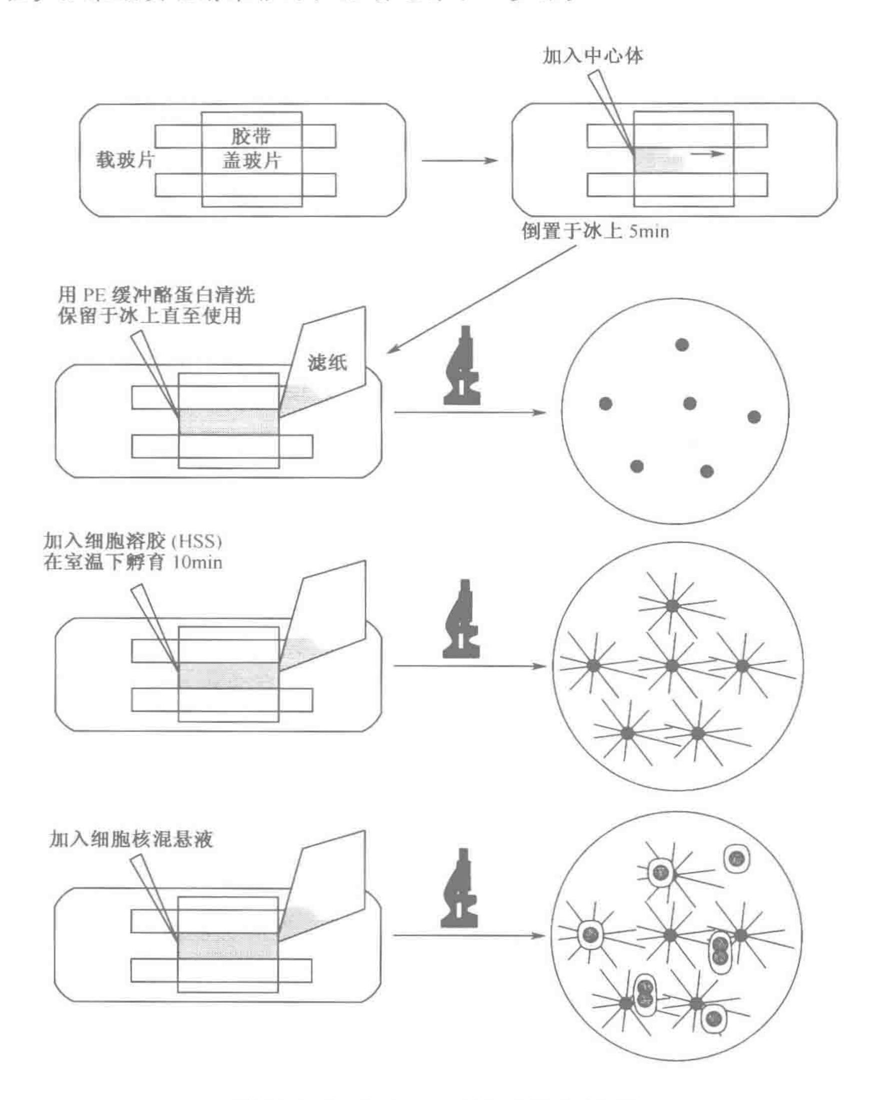


图 15.4.1　细胞核运动实验的流程图解

示意图说明该实验使用的由载玻片和盖玻片组装的灌流室和灌流技术。左栏显示各个步骤，右栏显示有代表性的显微视野。在第一步，中心体是散布于视野中的圆点。在第二步，微管是从中心体上发射出的线条。在第三步，细胞核在星体上移动

为了分析药物或生物试剂的效果，将进行下列步骤。

10a. 进行步骤 1～4。

11a. 将 2μl 药物、抗体或表达蛋白加入 18μl HSS 细胞溶胶中。

12a. 用 150μl ABC 缓冲液混悬 1 个等分量 DNA 结合微珠的细胞核。用磁珠浓缩器回收，弃去上清液。

13a. 用 10μl HSS 和实验复合物混合液（步骤 11a）混悬 DNA 结合微珠的细胞核。在微管积聚（步骤 5）后，使剩余的 10μl 混合液流经灌流室，以便用含实验复合物

的混合液置换正常的 HSS 细胞溶胶。

14a. 加入细胞核、HSS 和实验复合物混合液，在 20～22℃条件下孵育 20min，按步骤 9 计数。

为了进行免疫耗竭实验，将进行下列步骤。

10b. 用包被于微珠上的抗体使 HSS 细胞溶胶中的特异成分免疫耗竭。将耗竭的 HSS 细胞溶胶用作该实验的运动性细胞溶胶。

支持方案 1　从淋巴细胞分离中心体

材料（带√项见附录 1）

KE 37 人淋巴母细胞（ACC46；DSMZ 德国微生物和细胞培养样品）
√RPMI-10：含有 10% FBS（w/v）的 RPMI 1640 培养液
√用 DMSO 配制的 10mmol/L nocodazole 阻断溶液
√用 DMSO 配制的 10 mg/ml 松胞菌素 D 阻断溶液
√冰冷的 PBS
√含有 8%蔗糖的 PBS/10
√裂解缓冲液
√4ml 0.5mol/L K-PIPES（pH 7.2）和 1mmol/L EDTA 的混合液
√1 mg/ml DNase Ⅰ
√用梯度缓冲液配制的 40%、50%和 70%蔗糖（w/v）
液氮
√PE 缓冲液
甲醇，－20℃
用 PBS 配制的 0.1% Triton X-100（w/v）
单克隆抗微管蛋白抗体（Amersham）
二抗
烟酸己可碱（hoechst）
多克隆抗中心粒周围抗体（如 γ-微管蛋白和中心粒周围蛋白 pericentrin，可任意选择）
250 ml 塑料瓶
2 L 旋转培养瓶
500 ml 离心瓶
临床诊断用离心机或类似产品，装有带吊桶的转子，可用于 50 ml 离心管
高速离心机（如 Sorvall RC-26 或类似产品）
大容量转子（GSA 或类似产品）
50 ml 带盖锥形离心管
10 ml 塑料吸管
125 μm 尼龙过滤网（Millipore）

Beckman SW 28 和 SW 28.1 离心管
超速离心机
超速离心机 SW 28 转子，带有 SW 28 和 SW 28.1 离心管桶
18 G 针头
折射计
改良的透紫外线玻璃管（Evans et al. 1985；单元 12.7）
直径为 11～12 mm 盖玻片（用酸洗过）
HB-4 或 HB-6 转子
镊子
有盖玻片格的固定缸

1. 将 1 L KE 37 细胞悬液放入 4 个 250 ml 塑料瓶中，用 RPMI 1640-10 培养约 1 周。
2. 在制备中心体前一天，将 1 L 细胞悬液移入 2 L 旋转培养瓶，然后添加 1 L RPMI 1640-10。
3. 在提纯当天，有 2 L 密度接近于 1.5×10^6 个/ml 的细胞（总数为 3×10^9 个细胞）。
   在指数生长期，将细胞密度维持在 1×10^6～4×10^6 个/ml 是很重要的。
4. 加入 60μl 10mmol/L nocodazole 至终浓度为 33 μmol/L，另加入 200μl 10 mg/ml 松胞菌素 D 至 1μg/ml 终浓度。37℃，连续搅拌孵育 1h。
5. 将培养物移入 500 ml 离心瓶，4℃，650*g* 离心 15min。
6. 操作要尽可能快，最好两人操作。用冰冷的 PBS 重悬细胞至最大总容量为 160 ml。将细胞悬液移入 4 个 50 ml 带盖的锥形离心管。在 4℃条件下，用临床诊断离心机 500*g* 离心 5min，吸去上清液。用 PBS 重复清洗和离心 1 次。
7. 用含有 8%蔗糖的 PBS/10（每管≥25 ml）迅速而轻柔地重悬细胞。4℃，250*g* 离心 5 min，吸去上清液。
8. 在每管沉淀细胞中，加入 10 ml 裂解缓冲液，裂解细胞。然后，用 10 ml 吸管上下轻轻吹打，使沉淀分散，不要产生气泡。在每管中加入裂解缓冲液至 20 ml（总容量不超过 90 ml）。将各管慢慢上下反转 2 或 3 次，然后在冰上孵育 5 min。
9. 在 4℃条件下，2000*g* 离心 10 min。用 125μm 尼龙网过滤上清液，取 300μl 样品，用作计数。
10. 将 1.8ml 0.5mol/L K-PIPES（pH 7.2）和 1mmol/L EDTA 混合液以及 90μl DNase Ⅰ阻断缓冲液加入已收集的 90 ml 上清液。在 3 个 Beckman SW 28 超速离心管中，用 10 ml 塑料吸管各加入 5 ml 用梯度缓冲液配制的 50%蔗糖，然后在每管的蔗糖上面加入 30 ml 溶胞产物。
11. 在 4℃条件下，20 000*g* 离心 20min。每管吸去上清液，保留位于蔗糖层上面约 2ml 的溶胞产物。为了估计蔗糖层上面 2 ml 溶胞产物的量，可准备容纳蔗糖容量和 2 ml 液体量的空白管。在管的适当高度作一标记，与含有中心体样品的离心管比较。
12. 收集剩余的 2 ml 上清液和 2 ml 50%蔗糖层溶液。从 3 个梯度管的离心液共收集 12 ml 总容量。保留 100 μl 用作计数，将其余的充分混合，加于 SW 28.1 超速离心

管内非连续梯度的蔗糖上面。非连续梯度蔗糖含有 2.0 ml 70%蔗糖、1.5 ml 50%蔗糖、1.5 ml 40%蔗糖和 12.0 ml 中心粒悬液（从 3 个梯度管收集到，约含 25%蔗糖）。

13. 4℃，110 000g 离心 75min，除去上层离心液至 40%蔗糖层。然后，将带有 18 G 针头的注射器插入管底，收集 0.4 ml 细胞组分。用折光计检测各组分。从 40%和 70%蔗糖层之间，取多个 5μl 的细胞组分，用免疫荧光法计数中心体。将剩余的细胞组分迅速地在液氮中冷冻，但不要分装。在－70℃条件下储存。将 40%蔗糖层以上和 70%蔗糖层以下的离心液丢弃。

    该实验，获取高浓度的中心体（约 2×10^8 个/ml）是很重要的。用含有理想浓度中心体的离心液段获得中心体，一般为 30%～50%。

14. 准备改良的透紫外线玻璃管，用于盛 5μl 步骤 9 和步骤 12 取得的样品。在管底的垫子上部放置可移动片架，再在片架上部放 1 张直径为 11 mm 的清洁盖玻片。
15. 用 15 ml 带盖的管，通过上下反转数次，将 5μl 分量与 5 ml PE 缓冲液混匀。然后，用吸管将混悬液加入准备好的透紫外线玻璃管。4℃，23 600g 离心 10min。
16. 从玻璃管中小心地取出每张盖玻片：用顶部弯曲的薄铲从玻璃管取出片架，再用镊子将盖玻片移入预冷甲醇中。－20℃，用甲醇将盖玻片固定 5 min（记住中心体位于盖玻片的哪一面上是很重要的）。从固定液中取出盖玻片，放入用 PBS 配制的 0.1% Triton X-100 中。
17. 用单克隆抗微管蛋白抗体进行免疫荧光染色，随后加入合适的二抗（单元 5.3）。在二抗中加入烟酸己可碱，以检测 DNA 污染。
18. 以容易观察中心体的放大倍数观察样品（中心体通常为成对圆点，也有单个圆点）。计数几个显微视野内中心体的总数目，以得出平均数。用镜台上的测微尺测量视野大小。推断透紫外线玻璃管的总横截面积，以得出每个 5μl 分量或取自步骤 9 和步骤 12 分量中总中心体的数目。
19. 将取自蔗糖梯度离心液段的中心体组分在－80℃条件下冻存（≥1 年）。有关中心体的进一步分装和在运动实验中的滴定法见支持方案 2。

支持方案 2　浓缩中心体的滴定

附加材料（同见基本方案）

大分量中心体（见支持方案 1）
液氮
用于分装的 0.5 ml 微量离心管

1. 在冰上准备约 100 个 0.5 ml 微量离心管。
2. 迅速融化一个大分量的中心体（400～500μl），将分量管上下反转数次或用吸管上下吹打，使其轻柔混合，但不要产生气泡。然后，将中心体分装成 5μl 等分量，迅速在液氮中冷冻。
3. 按单元 15.1 的支持方案 1 制备 8 个灌流室。

4. 将 4 个 5μl 分量的中心体解冻，以不同的体积重悬每个分量，终浓度范围为5×10^6～20×10^6个/ml。将每个中心体样品分为两份，加入两个灌流室。
5. 对于每个样品，按基本方案的步骤 2～7 确定哪种中心体浓度能获得聚集于中心体处细胞核的最佳数值。

根据经验，中心体的终浓度在 7.5×10^6个/ml 范围内常获得较佳数值。该浓度与每 50μm² 显微视野含 2 或 3 个中心体的密度相对应。理想数值是在微管的自由积聚与中心体引起的积聚相互竞争的结果。

支持方案 3　制备用于细胞核组装的分裂间期提取物

对于处理青蛙和制备非洲蟾蜍卵提取物的常规方法见单元 12.5。下述方案使用通过人绒毛膜促性腺激素（HCG）刺激青蛙过夜后收集的卵，并基于已发表的方案（单元 12.5）。该操作的基本原则在图 15.4.2 中说明。

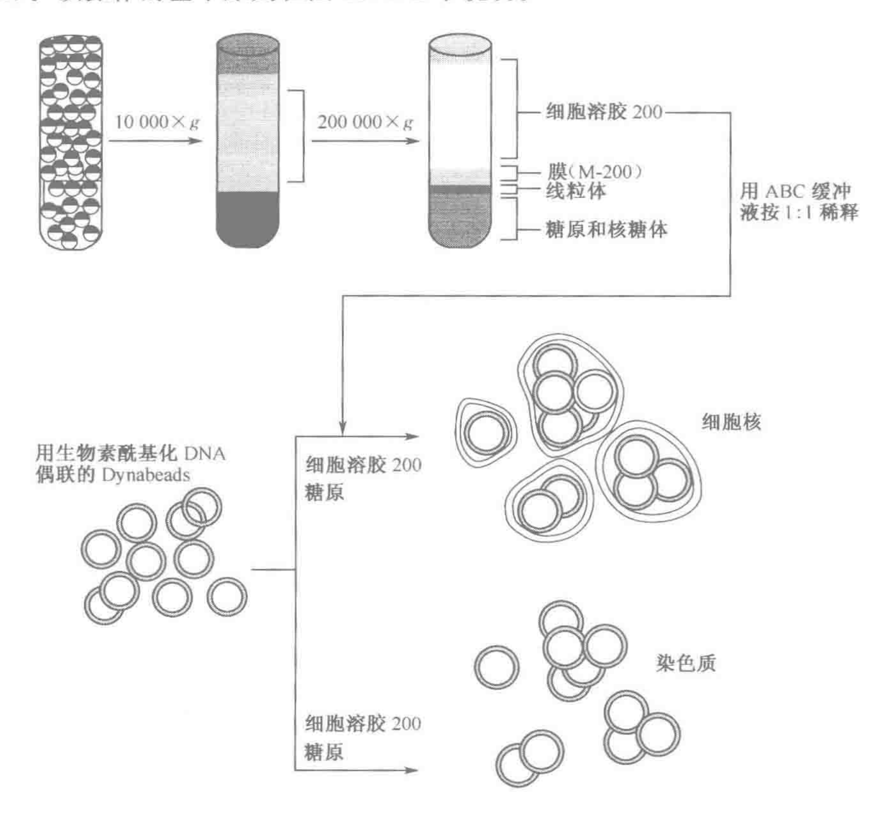


图 15.4.2　从分离的提取物组装细胞核

图解说明用分离的提取物组装细胞核所需要的基本步骤。在此显示的方案中，细胞溶胶 200 和 M-200 细胞组分的提取在支持方案 3 叙述。这些细胞组分分开冷冻，然后如同支持方案 5 所述用 DNA 偶联的 Dynabeads 磁珠重组。DNA 偶联的 Dynabeads 的制备在单元 12.7 叙述。如果在组装过程中省略 M-200 膜组分，分裂间期的染色质可在 DNA 上组装，但细胞核的完整组装需要 M-200 膜组分。合成的细胞核常常含有复合的 Dynabeads，这与此实验中显示的含复合 Dynabeads 的细胞核非常相似

注意：所有用活体动物的实验方案，必须首先经过研究机构的动物保护与使用委员会（IACUC）评价和批准，或者必须遵守政府有关实验动物保护与使用的规定。

注意：保证所有玻璃器皿是清洁的，并在使用前用蒸馏水清洗过。此外，在接触卵之前将所有玻璃器皿用缓冲液弄湿，因为卵将黏到玻璃器皿上使卵活化或裂解。

材料（带√项见附录1）

5～7只青蛙

√100 U 妊娠母马血清促性腺激素（PMSG）

√500 U HCG

√MMR

√脱胶溶液

√S裂解缓冲液

√S裂解附加缓冲液

√用DMSO配制的10 mg/ml 松胞菌素D阻断溶液

√1mol/L DTT

√蛋白酶抑制物（LPC）

√2.5mol/L 蔗糖

甘油

用于分量冷冻的液氮

√S裂解附加缓冲液和500mmol/L 蔗糖的混合液

1 ml 注射器和27 G针头

400 ml 烧杯

SW 50 超净离心管（Beckman）

Pasteur 吸管，用锉刀切成宽口径，并在火上磨光

Sarstedt 13 ml 套管

2 ml 注射器和18 G针头

临床诊断用离心机

Sorvall RC5 离心管

装有橡胶套管的HB-4 转子（Sorvall）

5 ml 带盖的 polyproponate 管

超速离心管

SW 55 转子

供分装细胞溶胶和膜的500μl 微量离心管

1. 取5～7只青蛙，用1 ml 注射器和27 G针头将0.5 ml 100 U PMSG经皮下注入背部的淋巴囊。至少在制备提取物前4天（10天以内）注射。青蛙在注射PMSG后停止进食。
2. 用前12～18h，青蛙皮下注射0.5 ml 500 U HCG。然后，将每只青蛙分别放入含有500 ml MMR的容器，16℃，过夜。

3. 每只青蛙的卵分别放入 400ml 的烧杯中（以便于在下列步骤中彼此分开）。如果取的样本中已裂解、有斑点或呈线状的卵超过 5%，将此样本丢弃。
4. 倒出 MMR，将 50～100 ml 脱胶溶液加入烧杯。轻轻旋动烧杯，并换液数次，直至卵开始聚集（通常约为 5min，但最短时间也需要完全移除胶状层。进一步的孵育应确保卵的质量）。
5. 用 50～100 ml MMR 洗卵 3 次。由于卵除去胶状层后很容易碎，下列步骤操作要快，直至裂解和离心。确保卵始终在缓冲液内。除去损伤的卵（白色和肿胀、黑色素减少或有斑点）。
6. 尽量倒出 MMR，但使卵浸在最小容量中。用 S 裂解缓冲液以同样方式将卵洗 2 次，再用 S 裂解附加缓冲液洗 1 次。
7. 用宽口径 Pasteur 吸管将卵移入含有 1 ml S 裂解附加缓冲液和 10μl 10 mg/ml 松胞菌素 D 阻断液（至 100 μg/ml 终浓度）的 SW 50 超净离心管。尽可能将离心管装满卵，然后吸去上层卵中的缓冲液。

   用吸管将卵移入离心管前，始终将含卵吸管的顶部放在离心管的缓冲液中。这样，可确保卵不接触空气。空气将引起卵溶解。
8. 将装满卵的 SW 50 超净离心管放入底部约含 0.5 ml 水的 Sarstedt 13 ml 套管中。在室温条件下用临床诊断离心机低速离心，150*g*，30s，使卵聚集，然后再次离心，700*g*，30s。吸去卵上面的缓冲液，丢掉有显著裂解现象的离心管。
9. 4℃，约 16 000*g* 离心 15 min，（用装有橡胶套管的 HB-4 转子），使卵溶解。从套管中取出离心管，垂直放于冰内。
10. 将 18 G 针头安在 2 ml 注射器上。在穿刺前，抽动针栓 1 次，使针栓松动。用纸巾擦拭离心管外壁，然后将离心管靠在冰桶的内壁上。将注射器针头插入离心管内，至清晰胞浆层的底部稍上方。使针孔朝上。抽取清晰的淡黄色胞浆，避开上方的黄色脂层和下方含有卵黄、线粒体和卵外层碎片的底层。取下针头，将针管内的细胞溶胶注入大小合适的带盖 polyproponate 管中（每 5 ml 含卵离心管将获得 1～2 ml 细胞溶胶）。
11. 收集较好的细胞溶胶，加入松胞菌素 D（终浓度为 10 μg/ml）、DTT（浓度至 1 mmol/L）和蛋白酶抑制物，体积分别为 1/1000。如果发生细胞溶胶污染，重复离心 16 000*g*，从残留卵黄或外层碎片的液段纯化细胞溶胶。取出清晰的细胞溶胶，将 2.5mol/L 蔗糖（浓度至 125mmol/L）加入细胞溶胶。
12. 4℃，将细胞溶胶超速离心，200 000*g*，60 min。

    从离心管的顶部至底部将出现以下各带：脂质、清澈细胞溶胶、金黄色核膜、淡灰色线粒体膜以及由糖原和核糖体组成的半透明沉淀。避免核膜被线粒体污染。在 200 000*g* 离心过程中，有时膜组分成带不理想，可见多个条带。延长离心时间，使膜组分很好地成带。提取时蔗糖浓度太低也可导致膜组分成带不理想。
13. 将清晰的脂层小心地吸出并丢弃。然后，将清澈细胞溶胶用 200μl 吸头移入另一管中（不要用 1000μl 吸头。从 5 ml 离心管收集约 2.5 ml 细胞溶胶）。取出并保存金黄色核膜组分（为组装细胞核的膜），直接进入步骤 15。注意避免收集淡灰色线粒体层。

14. 在4℃条件下再将细胞溶胶200 000g离心30min，以除去残留的膜组分和脂质。按步骤13取出细胞溶胶。将甘油加入细胞溶胶（终浓度为3%）。然后，以50μl等分量迅速在液氮中冷冻，并在−70℃条件下储存。这种细胞溶胶组分称为细胞溶胶200（C-200）。
15. 用过量的（≥10倍容量）S裂解附加缓冲液重悬金黄色核膜组分，然后将金黄色核膜组分加入0.5ml S裂解附加缓冲液和500mmol/L蔗糖混合液上面，4℃，26 000g离心20min。用S裂解附加缓冲液和500mmol/L蔗糖混合液将离心沉淀重悬，作为10×储备液（10×储备液表示1份混合液中含10倍容量的核膜组分）。然后，以10μl分量冷冻。这种核膜组分的储备液称为M-200。

支持方案4　高速上清液（HSS）的制备

附加材料（同见支持方案3，带√项见附录1）

√ABC缓冲液
台式离心机和TLA-100转子或Airfuge（Beckman）离心机和转子

1. 按支持方案3的步骤1～11进行。然而，在步骤11中将蔗糖浓度降低至100 mmol/L，而不使用125 mmol/L蔗糖。将细胞溶胶分装成50μl等分量，迅速在液氮中冷冻，在−80℃条件下储存，直至使用。
2. 实验当天，将1个分量的细胞溶胶解冻，用2倍容量的ABC缓冲液稀释。4℃，100 000g离心20min。（用Beckman Airfuge离心时，30psi，15 min），使膜沉淀。将细胞溶胶吸入新的离心管，放在冰上至使用（最长时间可达约4h）。

支持方案5　以DNA包被磁珠作为模板组装细胞核

材料（带√项见附录1）

细胞溶胶-200（见支持方案3）
√ABC缓冲液
DNA-Dynabeads
√用PBS配制的1% BSA（w/v）
√150 mg/ml糖原储备液
M-200（见支持方案3）
√50 mmol/L Mg-ATP
√0.5mol/L磷酸肌酸
√8 mg/ml肌酸激酶
1.4 mg/ml TRITC-BSA-NLS（转运底物；见单元12.4，支持方案2）
√固定液
Beckman台式超速离心机和TL-100转子（或Beckman Airfuge离心机和转子）
磁珠浓缩器

载玻片和清洁盖玻片
指甲油
落射荧光显微镜

1. 将 1 个 50 μl 分量的细胞溶胶-200 解冻。加入 50 μl ABC 缓冲液，4℃，100 000g，离心 30min（用 Airfuge 离心时，30psi，15min）。
2. 在离心过程中，制备 DNA 微珠。100 μl 反应液用 10 μl 微珠（70 μg/ml）。在吸出微珠前，将 DNA 微珠储备液充分混悬。将 10μl 微珠加入清洁管，再加入 200μl 用 PBS 配制的 1% BSA，将微珠吹打数次。用磁珠浓缩器回收微珠，小心除去缓冲液，然后重复清洗步骤。

   微珠上需有较高浓度的 DNA。应使 DNA 一端附着到微珠上（即 DNA 一端与生物素酰基化核苷酸相连），质粒不能太短。MCP 质粒约为 8 kb，用 MCP 质粒组装细胞核比 6 kb 质粒好得多。
3. 用稀释和离心后的细胞溶胶（见步骤 1，约 100μl）混悬清洗后的微珠，充分仔细地吹打，以使聚集物分散。不要将气泡引入细胞溶胶中。
4. 用吸管加入 10μl 150 mg/ml 糖原、10μl 核膜（M-200）、2μl 50 mmol/L Mg-ATP、2μl 0.5mol/L 磷酸肌酸和 1μl 8 mg/ml 肌酸激酶，然后通过吹打混匀。在 20℃条件下孵育 2～3 h（细胞核形成在 40 min 开始出现，随后逐渐增加，直至 3 h）。
5. 为了对功能性细胞核进行实验，取出 1 个 10μl 分量，加入 0.5μl 1.4 mg/ml TRITC-BSA-NLS，在 4℃条件下孵育 30 min。从该反应液中吸出 2μl，放于清洁载玻片上。然后，加入 5μl 固定液，盖上清洁盖玻片。如果需要保留样品，用指甲油封固盖玻片边缘。用落射荧光显微镜观察细胞核，以检测已聚集在转运底物上的细胞核。
6. 当观察到功能性细胞核时，将反应液增加 10～20 倍，并重复包括实验的上述步骤。为了冷冻，将甘油加至 10%（v/v），分装成 10μl 等分量，然后在液氮中冷冻，并在 −70℃条件下储存（可达数年）。

   可在冰上将冷冻的细胞核解冻，用 ABC 缓冲液清洗，再用磁珠浓缩器在冰上回收数分钟。然后，用细胞溶胶或其他缓冲液混悬。一般来说，冷冻的细胞核可保存约 90%或更高的活性。每个运动实验使用 1 个 10μl 分量的细胞核。

参考文献：Reinsch and Gonczy，1998；Reinsch and Karsenti，1997

撰稿人：Sigrid Reinsch

（谭玉珍 译）

附　　录

附录 1　试剂与溶液

这部分介绍的是本手册中细胞培养、组织处理和细胞生物学方法用到的缓冲液和试剂。配制溶液时应该用去离子水、双蒸水、最高级别的试剂。对于大部分储存在室温的溶液，建议经灭菌处理，用孔径 0.22μm 的滤膜过滤或经高压消毒，这对细胞培养的应用是必需的。储存的条件没有什么特别的要求，在室温下储存可长达六个月。任何试剂如果出现污染、沉淀或变色均应扔弃。一些试剂的配方包括试剂的成分可以在附录中找到。这些都以√标记。

注意：当操作有毒或致癌的化学试剂时一定要遵守实验安全指南并留意操作警示。

ABTS 试剂（单元 13.4）

ABTS 缓冲液：

0.05mol/L Na_2HPO_4

0.1mol/L 乙酸钠

用浓盐酸调节 pH 至 5.0

室温可储存 3 个月

ABTS 试剂：用前现配，将 11mg 2，2′-连氮-双-3-乙基苯并噻唑磺酸（ABTS；Sigma）溶于 0.5ml 水中。取 67μl 30% H_2O_2 与 7ml 水混合。将 0.5ml ABTS 溶液、10ml ABTS 缓冲液（见配方）、100μl H_2O_2 溶液充分混合。

这个量足够一个 96 孔板的测定。

受体溶液（单元 3.3）

5ml 分析缓冲液应加：

55mg ATP 钠盐（终浓度 10mmol/L）

0.5g 卵清蛋白（终浓度 5% w/v）

加分析缓冲液至 10ml

新鲜配制

乙酸凝胶缓冲液，4×(200mmol/L 乙酸，pH3.7～5.6)(单元7.2)

11.49ml 冰乙酸

加到 500ml 水中

用 1mol/L NaOH 调至 pH3.7～5.6

加水至 1000ml

4℃可保存一个月

酸，高浓度储存液

见表 A.1.1

酸沉淀溶液

1mol/L HCl

0.1mol/L 焦磷酸钠

核酸也可以用 10%（w/v）三氯乙酸（TCA）溶液沉淀，但是这个配方更便宜、更容易准备，一样有效。

表 A.1.1 浓酸浓碱的摩尔浓度及比重

试剂	分子质量	重量/%	摩尔浓度（近似值）	1mol/L 溶液/(ml/L)	比重
酸					
冰乙酸	60.5	99.6	17.4	57.5	1.05
甲酸	46.03	90	23.6	42.4	1.205
		98	25.9	38.5	1.22
盐酸	36.46	36	11.6	85.9	1.18
硝酸	63.01	70	15.7	63.7	1.42
高氯酸	100.46	60	9.2	108.8	1.54
		72	12.2	82.1	1.70
磷酸	98.00	85	14.7	67.8	1.70
硫酸	98.07	98	18.3	54.5	1.835
碱					
氢氧化铵	35.0	28	14.8	67.6	0.90
氢氧化钾	56.11	45	11.6	82.2	1.447
	56.11	50	13.4	74.6	1.51
氢氧化钠	40.0	50	19.1	52.4	1.53

酸洗盖玻片（单元 14.1）

将盖玻片在 2.7%（v/v）的盐酸溶液中浸泡 10min。用水充分冲洗后放在干净的地方或层流净化罩里晾干。在干净、密封的容器内室温储存几天到一个星期，以减缓表面变为疏水。

酸洗玻璃珠（单元 3.9）

以玻璃珠裂解酵母，最好用 0.4～0.5mm 的玻璃珠（BDH 或 Sigma）。在通风橱中将玻璃珠浸泡在浓硝酸或 1mol/L 盐酸中 2h（注意：戴安全护目镜、含腈手套，穿长实验服）。浸泡过程中，用一个长的玻璃棒小心地搅拌玻璃珠几次。用去离子水充分地冲洗珠子，直到去离子水加入前和加入后的 pH 不变为止（如果用一个过滤装置则更有利）。将珠子转移到一个玻璃碟子或金属盘子中，放到约 200℃的真空电炉中。搅动几次以保证所有的珠子都完全干燥。一旦珠子完全干燥并冷却到室温，把它们放在玻璃瓶中保存在 4℃。

30%丙烯酰胺/0.8%双丙烯酰胺（单元 7.3）

30g 丙烯酰胺

0.8g 双丙烯酰胺

加水至 100ml

用孔径 0.2～0.45μm 的滤膜（如 Micro Filtration Sistems，硝酸纤维素，0.2μm）过滤溶液。保存在 4℃（至少稳定 3 个月）

提示：丙烯酰胺具有神经毒性。处理固体的丙烯酰胺时要戴手套和防毒面具。处理丙烯酰胺溶液时要戴手套，严禁用嘴吸取丙烯酰胺溶液。

丙烯酰胺储存溶液：30%（w/v）丙烯酰胺，1.6%（w/v）双丙烯酰胺（单元 7.4）

用表 7.1.1 中的配方，增加双丙烯酰胺的量，每 100ml 终体积中加到 1.6g。任何高质量的电泳级双丙烯酰胺溶液都是令人满意的。建议用活性炭来处理溶液。每 500ml 丙烯酰胺溶液用 5g 活性炭（Merck），然后将炭过滤清除。用 0.45μm 滤器过滤终溶液。4℃暗处储存≤30 天。

琼脂（单元 1.2）

溶解 2%（w/v）琼脂（如 Difco）于水中，在微波炉中加热煮沸。于 45℃维持柔软琼脂。

琼脂糖，2%（w/v）（单元 7.3）

将 2g 琼脂糖与 100ml 水混合。在一个热的盘子中搅拌至溶解。将溶液保存在接近 100℃。分装至 25ml 带盖的试管中，每管 5ml。让溶液凝固，4℃保存，至少稳定 3 个月。

琼脂糖缓冲液（用于霉菌培养）（单元 11.4）

0.5mol/L NaCl

2mmol/L KH_2PO_4/KOH，pH6.8

√1mmol/L EGTA

√5mmol/L $MgCl_2$

用 0.2μm 的过滤器过滤消毒

4℃保存

用还原缓冲液配制琼脂糖，1.5%（w/v）（单元 7.3）

将 0.15g 琼脂糖与 10ml 还原缓冲液（见配方）混合。在沸水浴中加热至溶解。临用前配制。

琼脂糖平板混合剂（单元 14.1）

底层是碳酸氢盐缓冲液的琼脂糖平板：

琼脂糖溶于 HBSS（见配方），煮沸，终浓度为 2.4%（w/v）。在含碳酸氢盐缓冲液的 RPMI1640 中加入 20%的热灭活小牛血清（BCS），制备成分离溶液。当琼脂糖溶液冷却到 50℃时，以 1∶1 的比例混合两种溶液（终浓度为 1.2%琼脂糖、10%BCS，0.5×RPMI，0.5×HBSS）并立即使用。

底层是 HEPES 缓冲液的琼脂糖平板：

将 2.4%（w/v）琼脂糖溶于消毒的水中，煮沸。在一个分离容器中，用不含碳酸氢盐的 2×RPMI1640（来自低内毒素的 10×RPMI1640 浓缩液，Sigma）稀释 1mol/L HEPES（Life Technologies）至 20mmol/L。加 20%（v/v）热灭活的 BCS 至 RPMI/HEPES 中，并调整 pH 至 7.2。当琼脂糖溶液冷却到 50℃时，以 1∶1 的比例混合两种溶液（终浓度 1.2%琼脂糖、10%BCS、1×RPMI）并立即使用。

这两种平板的制备，琼脂糖必须煮沸并在加入蛋白溶液之前冷却，以避免蛋白质变

性。对于无血清的实验，可以用1％（w/v）BSA或0.25％明胶来代替20％的BCS。

含血清或蛋白质（但是无琼脂糖）的培养基可以过滤消毒后在4℃条件下保存6个月。

碱性磷酸盐底物缓冲液（单元7.7）

√100mmol/L Tris·Cl，pH9.5

√100mmol/L NaCl

√1.5mmol/L $MgCl_2$

碱性磷酸二酯酶I反应缓冲液（单元3.2）

5.0ml 100mmol/L $Na_2CO_3/NaHCO_3$，pH10.5（终浓度40mmol/L）

√1.25ml 1％（v/v）Triton X-100（终浓度0.1％）

√1.0ml 20mmol/L TMP溶液（终浓度2mmol/L）

加水至10.0ml

新鲜配制并在室温使用

这个体积足以对所有的制备组分和空白底物进行两种孵育时间的双份分析（够50个测试管）。

AL蛋白酶抑制剂配方（单元12.6）

用水配制10mg/ml的抑蛋白酶肽和亮抑蛋白酶肽。按1∶1比例混合上述两种溶液，抑蛋白酶肽和亮抑蛋白酶肽溶液的终浓度为5mg/ml。－70℃保存。

交替HPLC流动缓冲液（单元13.11）

382.12g盐酸胍（终浓度4mol/L）

6.05g Tris碱（终浓度50mmol/L）

加水至900ml

加热溶解

用1mol/L HCl调pH至6.0

加5ml Triton X-100（终浓度0.5％ v/v）

加水至1L

4℃可保存1个月

氨基酸混合液（单元12.1）

氨基酸	数量
丙氨酸	13.35mg
精氨酸	31.5mg
天冬酰胺	22.5mg
天冬氨酸	20mg
半胱氨酸	26.25mg
谷氨酰胺	22mg
谷氨酸	22mg
甘氨酸	11.25mg
组氨酸	31.35mg

异亮氨酸	19.5mg
亮氨酸	39mg
赖氨酸	27.3mg
甲硫氨酸	15mg
苯丙氨酸	24.75mg
脯氨酸	17.25mg
丝氨酸	15.75mg
苏氨酸	17.85mg
色氨酸	30.6mg
酪氨酸	27mg
缬氨酸	33mg

加水至 80ml。用 1mol/L KOH 调 pH 至 8.2，然后加水至 100ml。过滤除菌，1ml 分装，－20℃可储存 2 年。

这种 100ml 的储存液含有 3mmol/L 的亮氨酸和缬氨酸，1mmol/L 的甲硫氨酸，其他的 18 种氨基酸均为 1.5mmol/L。

除了缬氨酸、亮氨酸、赖氨酸和甲硫氨酸，氨基酸溶液配制如上述，除非不加这种氨基酸。

乙酸胺，10mol/L

用 150ml 水溶解 385.4g 乙酸胺，加水至 500ml。

氯化铵溶液（单元 4.1）

√0.02mol/L Tris·Cl，pH7.2

0.14mol/L NH_4Cl

4℃可保存 6 个月

氨水，高浓度储存液

见表 A.1.1.

钼酸胺，0.42%（w/v）（单元 3.2）

27.8ml 浓硫酸（终浓度 1mol/L）

4.2g 钼酸

加水至 1L

室温可长期保存

过硫酸铵，2.5%（w/v）（单元 7.3）

0.25g 过硫酸铵

加水至 10ml

临用前配制

硫酸铵，饱和的

76g 硫酸铵

100ml 水

搅拌加热至沸点下，室温过夜

复性缓冲液，5×（单元 12.9）

√10mmol/L Tris·Cl，pH7.8

√1mmol/L EDTA

√1.25mol/L KCl

−20℃可保存 6 个月

阳极缓冲液（单元 7.1）

121.1g Tris 碱（终浓度 0.2mol/L）

500ml 水

用浓 HCl 调 pH 至 8.9

用水稀释至 5L

4℃可保存 1 个月

Tris·Cl 终浓度为 0.2mol/L，pH8.9。

蚜栖菌素，10μmol/L（单元 11.2）

用 DMSO 配制 10μmol/L 蚜栖菌素（Sigma）

−80℃保存少于 3 个月

蚜栖菌素储存液，5mg/ml（单元 12.6）

用高质量的 DMSO（如 Pierce）配制 5μmol/L 蚜栖菌素。−70℃可保存数月。

分析缓冲液（单元 3.7）

用 100ml 水溶解 0.71g Na_2HPO_4（终浓度 50mmol/L）。另取 100ml 水溶解 0.68g KH_2PO_4（终浓度 50mmol/L）。将 KH_2PO_4溶液加入 Na_2HPO_4溶液至 pH7.7，4℃可保存 1～2 天。

分析缓冲液（单元 12.8）

√50mmol/L HEPES，pH7.4

√100mmol/L NaCl

0.1%（w/v）CHAPS

1mmol/L EDTA

10%（v/v）甘油

10mmol/L 二硫苏糖醇，每次使用前新鲜加入

4℃可长期保存

分析缓冲液Ⅰ（单元 3.4）

在 100ml 水中加：

2.94g 乙酸钠（终浓度 180mmol/L）

用冰乙酸调 pH 至 5.0

加水至 200ml

4℃可保存 1～2 天

分析缓冲液Ⅱ（单元 3.4）

在 100ml 水中加：

11.52g 柠檬酸（终浓度 0.3mol/L）

17.64g 柠檬酸三钠 · $2H_2O$（终浓度 0.3mol/L）

3.5g NaCl（终浓度 0.3mol/L）

加水至 200ml

4℃可保存 1～2 天

ATP，100mmol/L

1g ATP（腺苷三磷酸）

12ml 水

4mol/L NaOH 调节 pH 至 7.0

水定容至 16.7ml

分装，－20℃可长期保存

ATP，100mmol/L（单元 11.3）

溶解 ATP 锂盐（Bochringer Mannheim）于水中，1mol/L NaOH 调节 pH 至 7.0。分装，－20℃可保存 1 年。

ATP 再生系统，20×（单元 12.3）

12ml 46mmol/L ATP，pH7.0（终浓度 20mmol/L）

12ml 233mmol/L 磷酸肌酸（终浓度 100mmol/L）

4ml 700U/ml 磷酸肌酸激酶（终浓度 100U/ml）

100～200μl 分装

－80℃可储存 3 或 4 个月

碱，高浓度储存液

见表格 A.1.1

BCA 试剂 A（附录 3B）

1g4，4′-dicarboxy -2，2′-biquinoline（Na_2BCA；Pierce 或 Sigma；终浓度为 1%，w/v）

2g $Na_2CO_3 \cdot H_2O$（终浓度 2% w/v）

160mg 酒石酸钠 · $2H_2O$（终浓度 0.16% w/v）

0.4g NaOH（终浓度 0.4% w/v）

0.95g $NaHCO_3$（终浓度 0.95% w/v）

除 $NaHCO_3$ 外，用去离子水溶解以上所有物质，并调节终体积至 100ml，每次加入少量 $NaHCO_3$ 调节 pH 至 11.25。将这种碱性试剂储存于塑料容器内，室温下可储存 1～3 周，4℃储存时间更长。

只有 Na_2BCA 的 2Na 盐可在中性 pH 条件溶解，游离酸不易溶。

BCA 试剂 B（附录 3B）

4g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$（终浓度 4% w/v）

100ml 水

室温下可储存 6 个月

珠缓冲液（单元 12.7）

29.2g NaCl（终浓度 2mol/L）

0.30g Tris 碱（终浓度 10mmol/L）

73mg EDTA，游离酸（终浓度 1mmol/L）

200ml 水

2mol/L HCl 调 pH 至 7.6

加水至 250ml

室温下可储存 1 年

碳酸氢盐缓冲液（单元 3.4）

250ml 水中加入：

26.5g 碳酸钠（终浓度 0.5mol/L）

21g 碳酸氢钠（终浓度 0.5mol/L）

加水至 500ml

pH 应为 9.9

4℃可储存 1～2 周

结合缓冲液 10×(单元 9.3)

√1.5mol/L NaCl

√220mmol/L HEPES，pH7.7

√20mmol/L $MgCl_2$

√0.75%（v/v）Triton X-100

200mmol/L β-磷酸甘油

√1mmol/L EDTA

√1mmol/L 正钒酸钠

√1mmol/L 苯甲磺酰氟（PMSF）

10μg/ml 抑蛋白酶肽

√10μg/ml 亮抑蛋白酶肽

2μg/ml 抑胃肽酶 A

4℃可储存 2 个月

结合缓冲液（单元 13.4）

按顺序混合下列成分：

√150mmol/L NaCl

√25mmol/L Tris·Cl，pH7.4

√1mmol/L $MnCl_2$

0.1%（w/v）BSA（组分Ⅴ，Sigma，纯度 99%）

新鲜配制

便利的配制方法是用 Tris/盐（25mmol/L Tris·Cl，pH7.4/150mmol/L NaCl）和 1mol/L $MuCl_2$ 储存液稀释，而后加入 BSA。

双缩脲总蛋白试剂（附录 3B）

0.6mol/L 氢氧化钠

12.0mmol/L 硫酸铜

31.9mmol/L 酒石酸钠钾

30.1 mmol/L 碘化钾

室温下可储存 6 个月

这个试剂来自由 Doumas 等（1998）建立的血清总蛋白量测定的候选参考方法，Sigma 诊断试剂可得。

封闭缓冲液

√10mmol/L Tris·Cl，pH7.4

√150mmol/L NaCl

10%（w/v）脱脂奶粉

100U/ml 青霉素 G

100μg/ml 链霉素

1mmol/L 叠氮钠

4℃可储存 4 周

封闭缓冲液（单元 7.7）

比色计检测：

对于硝酸纤维素和 PVDF：0.1%（v/v）Tween20，溶于 TBS（TTBS；见配方）

对于中性和带正电荷尼龙：

含 10%（w/v）脱脂奶粉的 Tris 缓冲盐溶液（TBS；见配方）。临用前制备。

TTBS 可在 4℃储存≤1 周。

发光检测：

对于硝酸纤维素、PVDF 和中性尼龙（如 Pall Biodyne A）：0.2%酪蛋白（如 Hammarsten grade 或 I-Block；Tropix）溶于 TTBS，临用前制备。

对于带正电荷的尼龙：6%（w/v）酪蛋白/1%（v/v）聚乙烯吡咯烷酮（PVP）溶于 TTBS（见配方），不断地搅动。将酪蛋白和 PVP 加入热的TTBS（65℃），搅拌 5min，使用前冷却，临用前配制。

封闭溶液（单元 13.4）

配制含 150mmol/L 氯化钠的 25mmol/L Tris·Cl 溶液。添加足够的 20%的叠氮钠储存液以达到终浓度 0.05%（w/v）。添加 BSA（组分Ⅴ，Sigma，纯度 99%）达 5%（w/v）的终浓度，用力搅拌溶解。用 50ml 离心管离心溶液，2800g，5min，然后将上清用一次性的 20ml 柱子过滤。4℃可保存 3 个月。

此溶液配制方便：在 Tris 盐溶液［25mmol/L Tris·Cl（pH7.4)/150mmol/L NaCl］中加入 20%叠氮钠储存液，而后加入 BSA，通过用力搅拌来溶解。然后离心、过滤，如上所述。最终浓度是 150mmol/L 氯化钠；25mmol/L Tris·Cl，pH7.4，5%（w/v）BSA 和 0.05%（w/v）叠氮钠。

斑点去除缓冲液

√62.5mmol/L Tris·Cl，21℃时 pH6.8

√2%（w/v）SDS

4℃可保存 6 个月，使用之前加 100mmol/L 2-巯基乙醇（2-ME）。

Bonner 盐溶液（单元 14.1）

√10mmol/L NaCl

√10mmol/L KCl

√2.7mmol/L $CaCl_2$

4℃保存（稳定期至少 1 个月）

硼酸缓冲盐液（单元 4.3）

0.015mol/L 硼酸钠

√0.15mol/L NaCl

用 1mol/L NaOH 调 pH 至 8.5，过滤消毒，室温长期保存。

脑匀浆基液（BHM）（单元 3.6）

在 100ml 水中加：

21.9g 蔗糖（终浓度 0.32mol/L）

√2.0ml 100mmol/L K_2EDTA（终浓度 1mmol/L）

√2.0ml 1mol/L Tris·Cl（终浓度 10mmol/L）

调 pH 至 7.4

加水至 200ml

4℃可保存 1～2 天

BRB80，5×(单元 12.7)

30.24g PIPES 游离酸（终浓度 0.4mol/L）

0.26ml 4.9mol/L $MgCl_2$（终浓度 5mmol/L；Sigma）

0.48g EGTA（终浓度 5mmol/L）

200ml 水

边搅拌边加氢氧化钾颗粒，直 PIPES 溶解。用 10mol/L 的 KOH 调整 pH 至 6.8。加水至 250ml，过滤消毒。4℃可保存 1 年。

BRB80 铺垫液（单元 12.7）

60ml 甘油（终浓度 60％v/v）

√20ml 5×BRB80（终浓度为 1×）

20ml 水

过滤消毒

4℃可保存 1 年

裂解缓冲液（单元 3.9）

√2mmol/L EDTA

25mmol/L 咪唑 HCl，pH7.0

4℃可保存数周

临用前，加 PMSF（见配方）和 N-对甲苯磺酰基-L-苯丙氨酸氯甲基酮（TPCK）至终浓度均达 1mmol/L，同时加抑胃肽酶 A 至终浓度为 2.5μg/ml（蛋白酶抑制剂储存溶液 C 参见配方）

为防止蛋白酶抑制物沉淀，缓冲液应保存在 4℃，而不是 0℃。

溴脱氧尿嘧啶核苷（BrdU），10mg/ml（27mmol/L）（单元 11.3）

100mg BrdU 溶于 10ml 水中。用孔径 0.45μm 的滤膜过滤消毒。等量分装，−20℃可保存 6 个月。

BSA（牛血清白蛋白），10%（w/v）

10g BSA（如 Sigma）溶解于 100ml 水中，用低蛋白结合的 0.22μm 的滤膜过滤消毒。储存在 4℃长期保存。

低浓度的储存溶液（如 1%）对多种应用都非常有用，可以用无菌水稀释 10%储存液。

BSA 有多种形式，它们在组分来源、制备方法、纯度、pH、价格等方面有差别，均可用。最常用的是组分Ⅴ。在应用中使用哪种合适，可能需要根据经验优化。

BSA，2mg/ml（w/v）（附录 3B）

将 200mg BSA（结晶或冻干或使用 Cohn 的组分Ⅴ制备物中的一种，含 96%～98%蛋白质和 3%～4%的水）加入 100ml 含 0.05%叠氮钠的 0.9%盐溶液。在 4℃可储存 6 个月。

BSA 包被的玻璃或塑料制品（单元 13.3）

将 1%的 BSA 溶液（见配方）加入用来收集细胞的试管、小平皿、微量离心管中。将巴斯德吸量管浸入 BSA 溶液中，试验前至少在室温放置 1h。用前用 HCMF（见配方）清洗。

悬浮在无蛋白溶液中的细胞容易贴附到塑料或玻璃表面，导致细胞的丢失和破坏。为避免这种情况，所有用于细胞准备的塑料和玻璃平皿、试管和吸量管等都要先用 BSA 包被一下。

如有必要，可以在 4℃条件下将 BSA 留在试管和吸量管中过夜。

用 BSA 预先包被试管、吸管、平皿对于旋转培养或细胞准备的实验是必需的，因为它们能防止细胞吸附到表面。

BSA，热变性，2%（w/v）（单元 13.10）

储存溶液（未变性）：2g 牛血清白蛋白（BSA）组分 V（Sigma）溶于 100ml 水，然后用孔径 0.22μm 的低蛋白结合滤膜过滤消毒，可在 4℃长期保存。

热变性工作溶液：临用前配，将需要的量在 65℃条件下加热 5min 或直到溶液开始出现轻微的半透明（非乳状）。在用于封闭阻断步骤前冷却至室温。不要储存热变性的 BSA。

BSA 溶液，0.5%（w/v）（单元 13.5）

0.5g 牛血清蛋白（组分 V，Sigma）

√0.02%（w/v）NaN_3

加 PBS 至 100ml

用孔径 0.45μm 的滤膜过滤消毒

4℃保存，保存期 1 个月

BSA 溶液，1%（w/v）（单元 13.3）

1g 牛血清蛋白（组分 V；Sigma）

√加 HCMF 至 100ml

用 NaOH 调 pH 至 7.4

0.45μm 的滤膜过滤消毒

4℃保存≤1 周

缓冲液 A（单元 12.2）

√50mmol/L 三乙醇胺，pH7.5

√50mmol/L 乙酸钾，pH7.5

6mmol/L 乙酸镁

√1mmol/L EDTA

250mmol/L 蔗糖

√1mmol/L DTT（临用前加）

√0.5mol/L PMSF（临用前加）

不含 DTT 和 PMSF 的溶液可于 4℃无限期保存

制备一个犬胰腺需要 500ml 缓冲液 A。

缓冲液 B，2×（单元 3.9）

1.2mol/L 山梨醇

40mmol/L 含钾的 MES，pH6.0

过滤消毒

4℃可保存数周

缓冲液 B（单元 12.2）

50mmol/L 三乙醇胺，pH7.5

6mmol/L 乙酸镁

√1mmol/L EDTA

1.3mol/L 蔗糖

√1mmol/L DTT（临用前加）

√0.5mmol/L PMSF（临用前加）

不含 DTT 和 PMSF 的溶液可于 4℃无限期保存

制备一个犬胰腺需准备 100ml 缓冲液 B。

缓冲液 C（单元 12.2）

50mmol/L 三乙醇胺，pH7.5

250mmol/L 蔗糖

√1mmol/L DTT（临用前加）

不含 DTT 的溶液可于 4℃无限期保存

制备一个犬胰腺需准备 100ml 缓冲液 C。

缓冲液 D（单元 12.2）

50mmol/L 三乙醇胺，pH7.5

1.5mmol/L 乙酸镁

√1mmol/L EDTA

√1mmol/L DTT（临用前加）

不含 DTT 的溶液室温可长期保存。

缓冲液 E（单元 12.2）

√100mmol/L 柠檬酸钠，pH5.5

√0.5mmol/L PMSF（临用前加）

不含 PMSF 的溶液室温可长期保存。

Ca^{2+} 缓冲液 10×（单元 12.3）

√20mmol/L HEPES 酸，pH7.4

√50mmol/L EDTA

√18mmol/L $CaCl_2$

4℃可保存 6 个月

$CaCl_2$，1mol/L

147g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$

加水至 1L

$CaCl_2$ 溶液（单元 13.5）

√250mmol/L $CaCl_2$

超纯水溶解

孔径 0.22μm 的滤膜过滤消毒

室温保存

不含 Ca^{2+}/Mg^{2+} 缓冲液（CMF 缓冲液）（单元 13.5）

√137mmol/L NaCl

√4 mmol/L KCl

0.4mmol/L $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$

0.18mmol/L KH_2PO_4

12mmol/L $NaHCO_3$

11mmol/L 葡萄糖，pH7.2

孔径 0.22μm 的滤膜过滤消毒

4℃保存，不超过 2 周

钙溶液 10×（单元 12.7）

√1ml 400mmol/L $CaCl_2$（终浓度 4mmol/L）

20.4μl 4.9mol/L $MgCl_2$（终浓度 1mmol/L，Sigma）

0.75g KCl（终浓度 100mmol/L）

加水至 100ml

分装，−20℃保存不限期

小牛肝脏 tRNA 5mg/ml（单元 12.1）

250mg 小牛肝脏 tRNA

加 DEPCW 至 50ml

过滤消毒，1ml 分装，−20℃可保存 2 年

牛胸腺 DNA 标准溶液（附录 3D）

现在有以牛胸腺 DNA 为标准品用于荧光分析的试剂盒（Amersham Biosciences）。

预先测定了 GC 含量、用氯化铯梯度纯化的 DNA，可用于吸收分光光谱法和荧光分光光谱法分析，这个产品可从 Sigma 公司得到（例如，牛胸腺 DNA，42% GC；梭状芽孢杆菌属产气荚膜羧菌 DNA，26.5% GC）。

CAPS 缓冲液，pH 11.0，0.2mol/L（单元 13.6）

22.1g CAPS（环己氨基丙烷磺酸）
加水至 450ml
用 6mol/L NaOH 调 pH 至 11.0
加水至 500ml
避免暴露于空气，室温可保存数周
1～2 个月后检测一次 pH，必要时用 NaOH 调 pH。

CAPS/盐溶液（单元 13.6）

8.8g NaCl
约 900ml 水
√50ml 0.2mol/L CAPS 缓冲液，pH 11.0
√1ml 1mol/L $CaCl_2$
加水至 1000ml
避免暴露于空气，室温可保存 1 个月
1 个月后检测一次 pH，必要时用 NaOH 调 pH。

碳酸盐缓冲液

1.6g Na_2CO_3（终浓度 15mmol/L）
2.9g $NaHCO_3$（终浓度 35mmol/L）
0.2g NaN_3（终浓度 3.1mmol/L）
加水至 1L
调 pH 至 9.5
注意：NaN_3有毒，配制、储存及处理都应小心。

阴极缓冲液（单元 7.1）

12.11g Tris 碱（终浓度 0.1mol/L）
17.92g 三羟甲基甘氨酸（终浓度 0.1mol/L）
1g SDS（终浓度 0.1% w/v）
加水稀释至 1L
无需调节 pH
4℃可保存 1 个月

细胞匀浆基液（CHM）（单元 3.5）

在 100ml 水中加入：
√30ml 1mol/L $MgCl_2$（终浓度 150mmol/L）
0.15g KCl（终浓度 10mmol/L）

√2.0ml 1mol/L Tris·Cl（终浓度 10mmol/L）

调 pH 至 6.7

加水至 200ml

4℃可保存 1～2 天

要配制含 1mol/L 蔗糖的细胞匀浆基液，就在 200ml 细胞匀浆基液中加 68.4g 蔗糖。

细胞裂解缓冲液（单元 6.1）

1%（w/v）Triton X-114（用预冷的储存液；见支持方案 1）

√10mmol/L Tris·Cl，pH7.4

√150mmol/L NaCl

√1mmol/L EDTA

4℃可保存 1 个月

10 μl/ml 100×蛋白酶抑制剂储存液；抗痛素、抑胃肽酶、亮抑蛋白酶肽的终浓度均为 10μg/ml，临用前加。

捕捉培养基（单元 8.1）

脉冲标记的培养基（见配方）包含 15mg/L 未标记的甲硫氨酸或等量剩余的用于放射标记的其他氨基酸。可以在 4℃保存 2 周。

捕捉溶液，50×（单元 8.6）

50mmol/L 甲硫氨酸

5mmol/L 半胱氨酸

过滤消毒，小量分装，－20℃可保存 1 年

限定化学成分的无血清培养基（单元 13.5）

MEM 中含：

5mg/ml 富含脂质的牛血清蛋白，内含 0.1%（w/v）IgG（如 AlbuMAX I，Life Technologies）

2 mmol/L L-alynyl-谷氨酰胺或二肽氨基乙酰-L-谷氨酰胺（如 AlbuMAX I，Life Technologies）

10μg/ml 转铁蛋白

10μg/ml 胰岛素

20ng/ml 三碘甲状腺素

40nmol/L/ml 黄体酮

200ng/ml 肾上腺酮

200μmol/L 腐胺

60nmol/L 硅酸钠

20ng/ml 神经生长因子（NGF）

新鲜配制

软骨素酶缓冲液（单元 13.11）

6.05g Tris 乙酸盐（终浓度 50mmol/L）

4.08g 乙酸钠（终浓度 30mmol/L）

0.1g 牛血清蛋白（BSA，终浓度 0.1mg/ml）

1.25g *N*-乙基马来酰胺（NEM；终浓度 10mmol/L）

7.44g EDTA（终浓度 20mmol/L）

加水至 900ml

加热溶解

用 1mol/L 乙酸调节 pH 至 8.0

√加 1ml 溶于乙醇的 0.2mol/L 苯甲磺酰氟（PMSF，见配方），同时迅速混匀以防沉淀（终浓度 0.2mmol/L）

√加 1ml Triton X-100（用于无水蛋白聚糖；终浓度 0.1% v/v）

缓慢搅拌直至 Triton 溶解

加水至 1L

4℃可保存 1 周

柠檬酸洗脱缓冲液（单元 13.6）

11.6g NaCl

29.4g 柠檬酸钠（柠檬酸三钠，二水合）

约 1800ml 水

√2ml（20% w/v）NaN_3

用 6mol/L HCl 调节 pH 至 5.5

加水至 2000ml

室温可保存 1 月

成分构成：0.1mol/L NaCl 和 50mmol/L 柠檬酸钠，pH5.5

CLAP，1000×(单元 11.5)

将 5mg 胰凝乳蛋白酶抑制剂、5mg 亮抑蛋白酶肽、5mg 抗痛素、5mg 抑胃肽酶 A（均购自 Sigma）溶解于总量为 5ml 的二甲基亚砜（DMSO）溶液中，各达到终浓度 1mg/ml。50μl 分装，−20℃可保存 1 年。

CLAP 蛋白酶抑制剂混合液，1000×(单元 12.5)

用二甲基亚砜配制：

10mg/ml 胰凝乳蛋白酶抑制剂

10mg/ml 亮抑蛋白酶肽

10mg/ml 抗痛素

10mg/ml 抑胃肽酶

分装，−70℃保存无限期

分解抑制剂：Ac-DEVD-CHO 20×(单元 12.8)

用 DMSO 配制 0.1mmol/L 或 0.05mg/ml Ac-DEVD-CHO（Biomol）储存液，用分析缓冲液 1∶50 稀释储存液（见配方），−20℃可保存数月。

分解底物：Ac-DEVD-pNA，2mmol/L(单元 12.8)

用分析缓冲液（见配方）溶解 1.3mg/ml，AC-DEVD-pNA（Biomol）终浓度

2mmol/L。避光−20℃保存。

CL 蛋白酶抑制剂混合液（单元 12.6）

用去离子水溶解亮抑蛋白酶肽，10mg/ml；用 DMSO 溶液溶解胰凝乳蛋白酶抑制剂，10mg/ml。将两者 1∶1 混合，终浓度为 5mg/ml，−70℃保存。

CMF-DPBS（不含钙镁离子的 Dulbecco 磷酸缓冲盐溶液）

8.00g NaCl（0.137mol/L）
0.20g KCl（2.7mmol/L）
2.16g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$（8.1mmol/L）
0.20g KH_2PO_4（1.1mmol/L）
加水至 1L
室温保存

有颜色的标志物（单元 6.3）

依次溶解蓝色右旋糖酐（平均分子质量 2 000 000 Da）1mg/ml、细胞色素 *c*（分子质量 11 900 Da）4mg/ml、重铬酸钾（分子质量 294 Da）1mg/ml 至含 0.1mol/L 氯化钠的 0.1mol/L 磷酸钠缓冲液中，pH7.0。用 0.22μm 的滤膜过滤。在 4℃可保存 1 周。

大孔径的凝胶（组分分离范围最低值为 10 000 Da 或更大）可以过滤细胞色素 *c*。

柱缓冲液 A（单元 13.6）

12.1g Tris・Cl
13.1g ε-氨基-η-己酸
11.8g 柠檬酸钠（柠檬酸三钠・$2H_2O$）
√2ml 20%（w/v）叠氮钠
加水至 1900ml
6mol/L HCl 调 pH 至 7.6
加水至 2000ml
实验当天新鲜制备，2 天之内使用
成分构成：50mmol/L Tris・Cl，50mmol/L ε-氨基-η-己酸和 20mmol/L 柠檬酸钠，pH7.6。

柱缓冲液 B（单元 13.6）

58.4g 氯化钠
6.0g Tris・Cl
6.5g ε-氨基-η-己酸
5.9g 柠檬酸钠（柠檬酸三钠・$2H_2O$）
加水至 800ml
√1ml 20%（w/v）叠氮钠储存液
6mol/L HCl 调 pH 至 7.6
加水至 1000ml
实验当天新鲜制备，2 天之内使用
成分构成：1mol/L NaCl，50mmol/L Tris・Cl，50mmol/L 6-氨基己烯酸和

20mmol/L 柠檬酸钠，pH7.6。

普通组织培养基

表 A.1.2 列出了 4 种普通组织培养基的配方。这些和其他一些含各种添加物的培养基都可以从许多供应商那里得到，有液体或粉末，有各种不同浓度如 1× 或 10×。

这些培养基必须借助空气中的 CO_2 来维持其 pH，都是通过碳酸氢盐来起缓冲作用。虽然多数培养基要求 5%CO_2 来维持 pH 在 7.4 左右，DMEM 则常规需要用 10% CO_2，因为它的碳酸氢盐的量要略高一些。如果 DMEM 放在 5%CO_2 中，至少有几天 pH 保持约 7.6。只有在 7.5%～10%的 CO_2 中 pH 才会保持在大约 7.4。另外缓冲能力也可以由 25mmol/L HEPES 来提供。

表 A.1.2　组织培养基的配方[a]

成　　分	每升含量			
	DMEM[b]	Ham's F-12 营养混合物	MEM[c]	RPMI 1640[d]
氨基酸				
L-丙氨酸	—	8.90mg	—	—
L-精氨酸·HCl	84.00mg	211.00mg	126.00mg	200.00mg
L-天冬酰胺·H_2O	—	15.00mg	—	50.00mg
L-天冬氨酸	—	13.00mg	—	20.00mg
L-半胱氨酸·HCl·H_2O	—	35.00mg	—	—
L-胱氨酸·2HCl	63.00mg	—	31.00mg	65.00mg
L-谷氨酸	—	14.70mg	—	20.00mg
L-谷氨酰胺	584.00mg	146.00mg	292.00mg	300.00mg
甘氨酸	30.00mg	7.50mg	—	10.00mg
L-组氨酸（游离碱）	—	—	—	15.00mg
L-组氨酸·HCl·H_2O	42.00mg	21.00mg	42.00mg	—
L-羟脯氨酸	—	—	—	20.00mg
L-异亮氨酸	105.00mg	4.00mg	52.00mg	50.00mg
L-亮氨酸	105.00mg	13.00mg	52.00mg	50.00mg
L-赖氨酸·HCl	146.00mg	36.50mg	73.00mg	40.00mg
L-甲硫氨酸	30.00mg	4.50mg	15.00mg	15.00mg
L-苯丙氨酸	66.00mg	5.00mg	32.00mg	15.00mg
L-脯氨酸	—	34.50mg	—	20.00mg
L-丝氨酸	42.00mg	10.50mg	—	30.00mg
L-苏氨酸	95.00mg	12.00mg	48.00mg	20.00mg
L-色氨酸	16.00mg	2.00mg	10.00mg	5.00mg
L-酪氨酸·2Na·$2H_2O$	104.00mg	7.80mg	52.00mg	29.00mg
L-缬氨酸	94.00mg	11.70mg	46.00mg	20.00mg
无机盐				
氯化钙（无水）	200.00mg	33.20mg	200.00mg	—
硝酸钙·$4H_2O$	—	—	—	100.00mg
硫酸铜·$5H_2O$	—	2.5μg	—	—
硝酸铁·$9H_2O$	0.10mg	—	—	—

续表

成　分	每升含量			
	DMEM[b]	Ham's F-12 营养混合物	MEM[c]	RPMI 1640[d]
硫酸亚铁·7H_2O	—	0.83mg	—	—
硫酸镁（无水）	97.67mg	57.22mg	98.00mg	48.84mg
氯化钾	400.00mg	223.60mg	400.00mg	400.00mg
碳酸氢钠	3.70g	1.176g	2.20g	2.00g
氯化钠	6.40g	7.599g	6.80g	6.00g
磷酸钠，二碱的（无水）	—	142.00mg	—	800.00mg
磷酸钠，单碱的·H_2O	125.00mg	—	—	—
硫酸锌·7H_2O	—	0.86mg	—	—
维生素				
生物素	—	7ug	—	0.20mg
偏多酸钙	4.00mg	0.50mg	1.00mg	0.25mg
氧化胆碱	4.00mg	14.00mg	1.00mg	3.00mg
叶酸	4.00mg	1.30mg	1.00mg	1.00mg
肌醇	7.20mg	18.00mg	2.00mg	35.00mg
烟酰胺	4.00mg	0.04mg	1.00mg	1.00mg
氨苯甲酸	—	—	—	1.00mg
吡哆醛·HCl	—	—	1.00mg	—
吡哆醇·HCl	4.00mg	0.06mg	—	1.00mg
核黄素	0.40mg	0.04mg	0.10mg	0.20mg
硫胺素·HCl	4.00mg	0.30mg	1.00mg	1.00mg
维生素 B_{12}	—	1.40mg	—	5.00μg
其他				
D-葡萄糖	4.50g	1.802g	1.00g	2.00g
谷胱甘肽（还原型）	—	—	—	1.00mg
次黄嘌呤钠	—	4.77mg	—	—
亚油酸	—	0.08mg	—	—
硫辛酸	—	0.21mg	—	—
酚红	15.00mg	1.20mg	10.00mg	5.00mg
腐胺·2HCl	—	0.161mg	—	—
丙酮酸钠	—	110.00mg	—	—
胸腺嘧啶脱氧核苷	—	0.70mg	—	—

a. DMEM：Dulbecco 改良的 Eagle 培养基；MEM：最低限量基本培养基（Eagle 之后）；RPMI：Roswell Park Memorial Institute。

b. 这个配方是含 L-谷氨酰胺的高糖培养基；DMEM 也有低糖的，1000mg/L。其他变化还有：＋HEPES，＋丙酮酸钠，＋吡哆醇，-肌醇，-磷酸盐，-谷氨酰胺，-酚红，-甲硫氨酸，-半胱氨酸，-氯化钙。

c. 这个配方含 L-谷氨酰胺，其他变化包括：＋Earle's 盐，-L-谷氨酰胺，-碳酸氢钠，-磷酸钠，＋D-缬氨酸（-L-缬氨酸），＋肌醇，＋Hanks 盐，＋非必需氨基酸。MEM 的 α 版本可以有或无核糖核酸和脱氧核糖核酸及其他变化。

d. 这个配方含 L-谷氨酰胺，其他变化包括：-酚红，-L-亮氨酸，-L-甲硫氨酸，-磷酸钠，-葡萄糖，-碳酸氢钠，＋HEPES，-叶酸，＋L-丙胺酸，-L-谷氨酰胺。

完全培养基（单元 2.4）

√RPMI 1640 培养基中含有：

√5%胎牛血清

100U/ml 青霉素

100μg/ml 链霉素

100μg/ml 庆大霉素

2mmol/L L-谷氨酰胺

10mmol/L HEPES

4℃可保存 2 周

完全 DMEM-20/HEPES/丙酮酸/HAT 或 HT（单元 4.1）

在完全 DMEM-20 培养基（见配方）中含 10mmol/L HEPES 和 1mmol/L 丙酮酸，加 100×HAT（次黄嘌呤/氨基喋呤/胸腺嘧啶脱氧核苷）或 100×HT 添加剂（见配方），4℃可保存 1 个月。

100×HAT 和 100×HT 添加剂都可购买商业化成品（Sigma）。

完全生长培养基（单元 2.1）

√500ml DMEM 或 RPMI 1640（Life Technologics 或 Sigma）

√60ml FBS（56℃热灭活 60min）

√5ml 1mol/L HEPES 缓冲液（Life Technologics）

5ml 100×非必需氨基酸混合物（Life Technologics）

5ml 100×L-谷氨酰胺（Life Technologics）

5ml 100×青霉素/链霉素（Life Technologics）

5ml 100×丙酮酸钠（Life Technologics）

4℃可保存 1 个月

汇合培养基（单元 13.10）

高葡萄糖的 DMEM 培养基中添加：

√10%（w/v）胎牛血清（FBS）

100U/ml 青霉素

100μg/ml 链霉素

4℃可保存 1 个月

转换缓冲液 20×(单元 12.7)

47.6g PIPES 游离酸（终浓度 630mmol/L）

√857μl 4.9mol/L $MgCl_2$（终浓度 16.8mmol/L；Sigma）

√0.5ml 0.5mol/L EGTA（终浓度 1mmol/L）

200ml 水

边搅拌边添加 KOH 颗粒，直到 PIPES 溶解。用 10mol/L 的 KOH 调节 pH 至 6.8，加水至终体积 250ml。过滤消毒，4℃可储存 1 年。

考马斯蓝 G-250 染色溶液（单元 7.1）

200ml 乙酸（终浓度 20%）

800ml 水

0.5g 考马斯蓝 G-250（终浓度 0.025%）

混合 1h，过滤（Whatman 1 号滤纸过滤）

室温保存不限期。

考马斯蓝染料（单元 13.12）

0.5%（w/v）考马斯蓝 R-250

30%（v/v）甲醇

10%（v/v）乙酸

室温可保存 6 个月

考马斯蓝染色溶液（单元 7.6）

配制 100ml：将 0.1g 考马斯亮蓝 R-250 溶于 30ml 甲醇和 20ml 水的混合溶液中。随后再加入 40ml 水和 10ml 的冰乙酸。在室温下可储存 4 个月。

注意：冰乙酸和甲醇是易挥发的有毒物质，故应在通风橱中操作。

这种溶液的成分是 0.1%（w/v）考马斯亮蓝 R-250 溶于甲醇/乙酸/水（3∶1∶6 v/v/v）

考马斯染料试剂（附录 3B）

100mg 考马斯亮蓝 G-250（终浓度 0.1% v/v）

50ml 95%乙醇（终浓度 4.7% w/v）

100ml 85%（w/v）磷酸（终浓度 85% w/v）

在一个小容器中，溶解染料于 25ml 乙醇中，将染料/乙醇溶液加到 800ml 去离子水中。用剩下的乙醇冲洗染料/乙醇容器，将清洗液加入溶液中。混合时，将酸缓慢加入溶液中并用去离子水调整终体积至 1000ml。用一张 Whatman2 号滤纸过滤溶液。放在玻璃容器中在室温下可储存 1 个月。

考马斯亮蓝 G-250（颜色索引 42655）可由许多不同的供应商提供（例如，ACROS，Aldrich，AMRESCO，Bio-Rad，Fisher Biotech，Fluka，ICN Biomedicals，J. T Baker，Research organics，Serva，Sigma，或 USB）

肌酸磷酸激酶，200U/ml（单元 12.1）

500U 肌酸磷酸激酶

√1.25ml 100mmol/L KCl

√20mmol/L HEPES-KOH，pH7.2

1.25ml 甘油

500μl 分装，−20℃可保存 1 年

甘油可防止酶在−20℃结冰。

结晶紫溶液，0.1%（w/v）（单元 13.1）

将结晶紫以 0.1%（w/v）溶解于 200mmol/L 2-(N-吗啉）乙磺酸（MES）溶液中，pH6.0。用孔径 0.22μm 的滤膜过滤，室温保存

注意：结晶紫有毒，小心操作，适当处理。

结晶紫溶液必须过滤。

结晶紫溶液，0.125%（w/v）（单元 1.9）

2.5g 结晶紫溶解于 100ml 甲醇中，搅拌过夜。用 Whatman 3 号滤纸过滤，室温可

保存 4 个月，使用前用水 1：20 稀释。

CSF-XB（单元 12.7）

√198ml 萃取缓冲液（XB）

√2ml 0.5mol/L K·EGTA（终浓度 5mmol/L）：分装为 2ml，−20℃保存不限期。

√40.8μl 4.9mol/L $MgCl_2$（终浓度 1mmol/L，Sigma）

使用当天新鲜制备

0.5mol/L K·EGTA 是用 40ml 水溶解 9.51g EGTA，用 10mol/L KOH 调 pH 至 7.7，再加水至 50ml。

加小牛血清的培养基（单元 13.10）

在高葡萄糖的 DMEM 培养基中添加：

10%（v/v）小牛血清

10U/ml 青霉素

10μg/ml 链霉素

4℃可保存 1 个月

半胱氨酸，2%（单元 12.6）

用水配制半胱氨酸，2%（w/v），NaOH 调 pH 至 8.0

每次使用新鲜制备

细胞松弛素 B，20mmol/L（单元 11.5）

10mg 细胞松弛素 B（Sigma）溶解于 1ml DMSO，50μl 分装，−20℃可保存 1 年

细胞松弛素 B 储存液，5mg/ml（单元 12.6）

用 DMSO 溶解细胞松弛素 B，配制成 5mg/ml 的储存液，−20℃保存 1 年

细胞溶胶缓冲液（单元 12.3）

√25mmol/L HEPES 酸，pH7.4

√125mmol/L 乙酸钾

4℃可保存 6 个月

DAPI 染色溶液Ⅰ（单元 11.1）

在 100ml 溶解有 0.1%（v/v）Triton X-100 的 PBS（PBS 见配方）中加入 0.1mg 4′，6-二氨基-2-苯基吲哚（DAPI；Molecular Probes）。避光，4℃可保存 1 个月。

DAPI 染色溶液Ⅱ（单元 11.1）

在 100ml PIPES 缓冲液（见配方）中加入 0.1mg 4′，6-二氨基-2-苯基吲哚（DAPI；Molecular Probes）。置于暗处或放在箔纸包裹的瓶子中，0～4℃可保存数周。

DEAE 洗脱缓冲液（单元 13.11）

87.66g NaCl（终浓度 1.5mol/L）

4.102g 乙酸钠（终浓度 50mmol/L）

240g 尿素（终浓度 4mol/L）

1.25g *N*-乙基马来酰胺（NEM；终浓度 10mmol/L）

7.44g EDTA（终浓度 20mmol/L）

加水至 900ml

加热溶解

1mol/L 乙酸调 pH 至 4.0

加 1ml 溶于乙醇的 0.2mol/L 苯甲磺酰氟（PMSF；见配方），同时迅速涡旋混匀防止沉淀（终浓度 0.2mmol/L）。

加 1ml Triton X-100（终浓度 0.1% v/v）

慢慢搅拌直至 Triton 溶解

加水至 1L

4℃可保存 1 周

DEAE 低 pH 缓冲液（单元 13.11.）

11.69g NaCl（终浓度 0.2mol/L）

4.102g 乙酸钠（终浓度 50mmol/L）

240g 尿素（终浓度 4mol/L）

1.25g *N*-乙基马来酰胺（NEM；终浓度 10mmol/L）

7.44g EDTA（终浓度 20 mmol/L）

加水至 900ml

加热溶解

用 1mol/L 乙酸调 pH 至 4.0

加入 1ml 用乙醇配制的 0.2mol/L 苯甲磺酰氟（PMSF；见配方），同时迅速涡旋混匀以防沉淀（终浓度 0.2mmol/L）

加 1ml Triton X-100（终浓度 0.1% v/v）

慢慢搅拌直到 Triton 溶解

加水至 1L

4℃可保存 1 周

DEAE-葡聚糖纤维素平衡缓冲液（单元 13.11）

11.69g NaCl（终浓度 0.2mol/L）

√50mmol/L Tris·Cl，pH8.0

240g 尿素（终浓度 4mol/L）

1.25g *N*-乙基马来酰胺（NEM；终浓度 10mmol/L）

0.783g 苯甲脒·Cl（终浓度 5mmol/L）

13.12gε-氨基己酸（终浓度 0.1mol/L）

7.44g EDTA（终浓度 20mmol/L）

加水至 900ml

加热溶解

用 1mol/L 盐酸调 pH 至 8.0

√加1ml 用乙醇配制的 0.2mol/L 苯甲磺酰氟（PMSF；见配方），同时迅速涡旋混匀以防沉淀（终浓度 0.2mmol/L）

√加 1ml Triton X-100（终浓度 0.1% v/v）

慢慢搅拌直到 Triton 溶解

加水至 1L

4℃可保存1周

变性裂解缓冲液（单元8.5）

√1%（w/v）SDS

√50mmol/L Tris·Cl，pH7.4

√5mmol/L EDTA

室温可保存1周（SDS在4℃会出现沉淀）

用前新鲜加入：

10mmol/L二硫苏糖醇（DTT，粉末）

√1mmol/L PMSF

2μg/ml亮抑蛋白酶肽（用水配制10mg/ml的储存液，－20℃可保存6个月）

15U/ml DNA酶I（配制15 000U/ml储存液，－20℃可保存2年）

1mmol/L 4-(2-氨乙基）苯磺酰氟（AEBSF），新鲜加入用水配制的0.1mol/L储存液，可代替PMSF，AEBSF储存液可在－20℃保存1年。

DEPC（焦碳酸二乙酯）处理溶液

加0.2ml DEPC至100ml待处理的溶液中，用力摇晃使DEPC溶解。将溶液高压灭菌使剩余DEPC失活。

注意：使用DEPC时要注意戴手套和在通风橱中操作，因为DEPC是一种可疑致癌物。

许多研究人员将他们用于RNA工作的溶液单独保存，以免“脏”的吸管伸入其中。

含Tris的溶液不要用DEPC处理，因为Tris能够使DEPC失活。

不含去垢剂的裂解缓冲液（单元8.5）

√PBS中含有：

√5mmol/L EDTA

√0.02%（w/v）叠氮钠

4℃可储存6个月

临用前加入：

10mmol/L碘乙酰胺（粉末）

√1mmol/L PMSF

2μg/ml亮抑蛋白酶肽（储备用水配制的10mg/ml储存液，－20℃可保存6个月）

1mmol/L 4-(2-氨乙基）苯磺酰氟（AEBSF），新鲜加入用水配制的0.1mol/L储存液，可代替PMSF，AEBSF储存液可在－20℃保存1年。

去垢剂IP缓冲液（单元8.6）

√50mmol/L Tris·Cl，pH7.5

√0.1mmol/L EDTA

√150mmol/L NaCl

0.5%（w/v）聚氧乙烯山梨坦单油酸酯（吐温20）

4℃可保存3个月

去垢剂/尿素缓冲液（单元 8.6）

√100mmol/L Tris·Cl，pH7.5

√200mmol/L NaCl

0.5%（w/v）聚氧乙烯山梨坦单油酸酯（吐温 20）

√2mol/L 尿素

4℃可保存 3 个月

显影溶液（单元 7.6）

在 98ml 水中溶解 6g 碳酸钠。加 50μl 37%的甲醛和 2ml 硫代硫酸盐溶液（见配方），用前新鲜配制。

注意： 甲醛具有毒性和致癌性，要戴手套并且在化学层流罩中处理这种浓的溶液(37%)。

发育缓冲液（DB）（单元 14.5）

5mmol/L $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$

5mmol/L KH_2PO_4

2mmol/L $MgSO_4$

√200μmol/L $CaCl_2$

最终 pH6.2

4℃可储存 6 个月

发育缓冲液琼脂（DB 琼脂）（单元 14.5）

在 100ml 的瓶子中，用 50ml DB（见配方）配制 1%（w/v）Difco Bacto 琼脂，并用液体循环高压灭菌 20min，室温可储存 6 个月。准备使用时，旋松瓶帽并用微波炉加热熔解。

含右旋糖酐的匀浆基液（DHM）（单元 3.3）

在 100ml 水中加入：

34.2g 蔗糖（终浓度 0.5mol/L）

2g 右旋糖酐（分子质量 225 000；终浓度 1% w/v）

1.21g Tris 碱（终浓度 50mmol/L）

1.16g 马来酸（终浓度 50mmol/L）

根据需要，用 50mmol/L Tris 碱或 50mmol/L 马来酸调整 pH 至 6.4

加水至 200ml

4℃可储存 1～2 天

右旋糖酐溶液，0.4mg/ml（单元 3.9）

2mg 右旋糖酐溶于 5ml 15%Ficoll 溶液（见配方）。涡旋混匀，新鲜配制并保存在冰上直至准备使用。

每个梯度至少需要 0.3ml。

右旋糖/精氨酸补充剂（单元 1.5）

50g 右旋糖

10g L-精氨酸·HCl

加 800ml 去离子水、蒸馏水，37℃通过搅拌和加热使成分溶解。加水将终体积调整为 1L。过滤消毒，按需要等体积分装（如每份 100ml 可用来配 1L 的支原体琼脂或肉汤）。冷冻保存（－20～－70℃），可达 12 个月。

透析血清（单元 8.2）

将血清放在透析管中，用 20 倍体积的 0.15mol/L 的氯化钠在 4℃通过搅拌来透析胎牛血清（附录 3C）。12～24h 更换透析缓冲液。从透析袋中取出血清，过滤除菌后将其保存在无菌容器中。4℃可保存 1 个月，－80℃可保存 1 年。

毛地黄皂苷溶液（单元 12.4）

储存溶液（20mg/ml）：

40mg 毛地黄皂苷（Cabiochem-Novabiochem）

加 DMSO 至 2ml

室温可储存 1 个月

工作溶液：在溶液使用的当天用转移缓冲液（TB；见配方）将其稀释到 70μg/ml。

DiI 储存及工作溶液（单元 13.10）

储存溶液：用乙醇配制 2.5mg/ml DiI（1.1-dioctadecyl-3，3，3′，3′-tetramethyl-indocarbocyamine perchlorate；Molecular Probes）。－20℃可储存 6 个月。

4μg/ml 的工作溶液：用汇合培养基（见配方）稀释 DiI 储存溶液至 4μg/ml，用孔径 0.22μm 滤膜过滤消毒。尽快使用，不要储存。

稀释基液（DM）（单元 3.7）

在 100ml 水中加入：

√12ml 100mmol/L EDTA 二钠（终浓度 6mmol/L）

√60ml 100mmol/L MOPS（终浓度 30mmol/L）

1.2ml 乙醇（终浓度 0.6% v/v）

用 1mol/L NaOH 调整 pH 至 7.2

加水至 200ml

4℃储存 1～2 天

稀释缓冲液（单元 12.3）

√25mmol/L HEPES 酸，pH7.2

87.5mmol/L 乙酸钾

1.25mmol/L 乙酸镁

－20℃可储存 6 个月

Dioxetane 磷酸盐底物缓冲液（单元 7.7）

√1mmol/L $MgCl_2$

0.1mol/L 的乙醇胺

√0.02%叠氮钠（可选用）

用盐酸将 pH 调至 10.0，即配即用

按照传统，AMPPD 底物缓冲液一直是含有 1mmol/L $MgCl_2$ 和 50mmol/L 的碳酸钠/碳酸氢钠，pH9.6，乙醇胺的使用可以得到一个更好的光学输出结果（Tropis

Western Light instructions)。

也可以选择 100mmol/L Tris · Cl(pH9.5)/100mmol/L NaCl/5mmol/L $MgCl_2$。

Dioxetane 磷酸盐显影溶液（单元 7.7）

0.1mg/ml AMPPD 或 CSPD（Tropix）或 Lumigen-PPD（Lumingen）底物溶于 dioxetane 磷酸盐底物缓冲液（见配方），临用前配制。Lumi-Phos 530（Boehringer Mannheim 或 Lumigen）是一种现成可用的溶液，能够直接应用到膜上。

这个浓度（240μmol/L）的 AMPPD 底物是被 Tropix Western Light 推荐的最低浓度。低 10 倍的浓度也可使用，但是需要更长的曝光时间。

二苯胺试剂（单元 3.8）

将 1g 二苯胺溶于 100ml 的冰乙酸（终浓度 1%，w/v），再加 2.75ml 浓硫酸（H_2SO_4）。可在室温下储存 1 个月

注意：加浓硫酸时要小心并使用护目镜。

二苯胺试剂（单元 11.4）

100ml 冰乙酸

1.5g 二苯胺

1.5ml 浓硫酸

0.5ml 16mg/ml 的乙醛储存液（用超纯水中配制，储存在黑烧瓶中，4℃可保存 1 个月）

临用前配制

裂解缓冲液（单元 12.9）

√15mmol/L HEPES（钾盐），pH7.6

√10mmol/L KCl

√5mmol/L $MgCl_2$

√0.1mmol/L EDTA

√0.5mmol/L EGTA

350mmol/L 蔗糖

4℃可储存 1 个月

临用前加入：

√1mmol/L DTT

1mmol/L 焦亚硫酸钠

√0.2mmol/L PMSF（也可见附录 2B）

1mmol/L 苯甲脒

二硫苏糖醇缓冲液（单元 3.5）

在 100ml 水中加入：

0.31g 二硫苏糖醇（终浓度 10mmol/L）

20ml 1mol/L Tris 碱（终浓度 0.1mol/L）

用盐酸调 pH 至 9.3

加水至 200ml

4℃可储存1～2天

DMEM

见表A.1.2

DMEM/F12培养基，已有添加物（单元1.2）

以1∶1（v/v）的比例混合DMEM和F12（见表A.1.2），过滤除菌后于4℃保存，使用时加入适量体积的血清。

DMEM（Dulbecco's modified Eagle medium，Dulbecco改良的Eagle培养基），已有添加物

DMEM，高葡萄糖配方（见表A.1.2，如Life Technologies），含如下成分：

√5%、10%或20%（v/v）FBS，加热灭活（必要时）

1%（v/v）的非必需氨基酸

2mmol/L L-谷氨酰胺

100U/ml青霉素

100μg/ml硫酸链霉素

若添加了非无菌物质，就需要进行过滤除菌。

4℃可保存1个月

包含这些添加物的DMEM有时也称作“完全DMEM培养基”。在培养基名称之后标明血清的百分比，如“DMEM/5%FBS”，名称中没有标注数字则说明不含血清。DMEM又称“Dulbecco最低限量培养基”（Dulbecco's minimum essential medium）

有时将Ham's F-12营养混合物（表A.1.2；可购买，如从Life Technologies）添加到DMEM中，所制成的培养基称为DMEM/F12。

由于DMEM含有较高浓度的碳酸氢盐，故需要约10%浓度的CO_2维持其pH为7.4。

含有谷氨酰胺和青霉素的培养基应尽少加温37℃，因一些成分，特别是谷氨酰胺，在37℃下很快降解。

DMEM/10% FBS（单元12.4）

DMEM培养基（如Life Technologies，1×液体，高葡萄糖）含如下成分：

√10%胎牛血清

√10mmol/L HEPES（pH 7.55）

100U/ml青霉素钠

100μg/ml硫酸链霉素

4℃可储存1个月

DNA酶和RNA酶溶液（单元7.3）

将2.50ml的1mol/L Tris·Cl，pH 7.0（见配方）、250μl的1mol/L $MgCl_2$（见配方）和2.2ml的水混合。加入5mg DNA酶（Worthington）并溶解，加入2.5ml RNA酶（溶液，Worthington）。混合均匀后，50μl或100μl分装，储存在－80℃（至少可稳定1年）。

所需RNA酶溶液的量是可变的，并且依赖于蛋白质的浓度，其标注于小管标签

(mg/ml)。RNA 酶的加入量应小于 200μl；如果用较大的量，水的量也应相应减少。

最终浓度为 0.5mol/L Tris·Cl，pH7.0，0.1mol/L $MgCl_2$，0.1%（w/v）DNA 酶和 0.05% RNA 酶。

Dounce 缓冲液（单元 8.4）

√10mmol/L Tris·Cl，pH 7.6

√0.5mmol/L $MgCl_2$

4℃可储存 1 年

临用前加：

10mg/ml 抑蛋白酶肽（Boehringer Mannheim-Roche）

√10mg/ml 亮抑蛋白酶肽（Sigma）

√1mmol/L PMSF（Sigma）

1.8mg/ml 碘乙酰胺（Sigma）

PMSF 应在用前即加，因为它在水溶液中很快水解。

DPBS（Dulbecco 磷酸缓冲盐溶液）

8.00g NaCl（0.137mol/L）

0.20g KCl（2.7mmol/L）

0.20g KH_2PO_4（1.1mmol/L）

0.10g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$（0.5mmol/L）

2.16g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$（8.1mmol/L）

0.10g 无水 $CaCl_2$（0.9mmol/L）

加水至 1L

DTT，250mmol/L（单元 12.1）

将 154mg DTT 加入 4ml 冰冷的脱氧（deacrate）水中，过滤灭菌并以 25～250μl 分装速冻，－20℃可储存 1 年。

一旦解冻一份使用，剩余溶液应丢弃。

DTT（二硫苏糖醇），1mol/L

在 10ml 水中溶解 1.55g DTT，过滤灭菌。分装，－20℃储存。

EB 缓冲液（用于提取卵母细胞）（单元 12.5 和 12.6）

42.68g 蔗糖（终浓度 0.25mol/L）

√10ml 5mol/L NaCl（终浓度 0.1mol/L）

√1.25ml 1mol/L $MgCl_2$（终浓度 2.5mmol/L）

2.4g HEPES（终浓度 20mmol/L）

用 NaOH 调整 pH 至 7.2，用水定容量至 500ml

避光保存在 4℃

EDTA（乙二胺四乙酸），0.5mol/L（pH 8.0）

溶解 186.1g $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ 于 700ml 水中，用 10mol/L NaOH（约 50ml；缓慢加入）将 pH 调至 8.0，加水至 1L，过滤除菌。

在样品完全溶解之前开始滴定，因为除非将 pH 调到 7.0～8.0，EDTA 即使以二

钠盐的形式在此浓度下也很难溶解。

EDTA，2%（w/v）（单元 7.3）

2g Na_2EDTA

加水至 100ml

用 NaOH 将 pH 调至 7.0

室温保存（可稳定数月）

溶解的时候需要滴定，如果不加入 NaOH，即使是使用二钠盐，EDTA 也很难溶解。

流出培养基（单元 10.2）

SF 培养基中含有：

0.1mmol/L 去铁敏（Sigma；将 10mmol/L 储存液用水稀释）

3μg/ml 人二铁转铁蛋白

新鲜配制

卵细胞裂解缓冲液，pH 7.7（单元 12.5）

250mmol/L 蔗糖

√2.5mmol/L $MgCl_2$

√1mmol/L DTT

√50mmol/L KCl

√10mmol/L HEPES

新鲜配制

EGTA，200mmol/L（单元 12.1）

7.6g EGTA

加水至 100ml

用 1mol/L NaOH 调 pH 至 7.0

高压灭菌

4℃可保存 6 个月

电泳缓冲液，1×(单元 7.5)

将 10×TAE（见配方）用水 10 倍稀释。每 2L 溶液中，加入 10ml 20%（w/v）的 SDS（见配方）。各组分的终浓度分别为：40mmol/L 的 Tris 乙酸，1mmol/L EDTA，0.1%（w/v）SDS。终 pH7.8～8.3。室温可储存 1 周。

该溶液也称为 1×TAE-SDS。应用时需要使用 2L。

电泳跑样缓冲液，pH 8.3（单元 13.12）

0.025mol/L Tris 碱

0.192mol/L 甘氨酸

√0.1%（w/v）SDS

室温可储存 1 年

电泳上样缓冲液 5×(单元 13.12)

√0.2mol/L Tris·Cl，pH 6.8

√5% (w/v) SDS
20% (w/v) 甘油
0.1% (w/v) 溴酚蓝
室温可保存 1 年

电穿孔缓冲液 (EB) (单元 14.5)

√10mmol/L 磷酸钠缓冲液，pH 6.1
50mmol/L 蔗糖
终 pH6.1
0.22μm 的滤器除菌
−20℃可储存 6 个月

洗脱缓冲液 (单元 8.5)

√1% (w/v) SDS
√100mmol/L Tris · Cl，pH 7.4
室温可保存 1 周
10mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT，使用前新鲜加入 DTT 粉末)

洗脱缓冲液 (单元 13.4)

√10mmol/L 乙酸钠，pH 3.25
√1mmol/L $CaCl_2$
√1mmol/L $MgCl_2$
√0.1% (w/v) Triton X-100 (Sigma，特级)
4℃可保存 1 个月

Endo D 缓冲液 (单元 12.3)

√50mmol/L 磷酸钠，pH 6.2
√5mmol/L EDTA
√0.2% (v/v) Triton X-100
−20℃可保存 6 个月

Endo H 缓冲液 (单元 12.3)

√0.1mol/L 乙酸钠，pH5.6
√0.3% (w/v) SDS
4℃可保存 1 个月
临用前加入 20% (v/v) 的 2-巯基乙醇

能量再生混合物，20× (单元 12.6 和 12.8)

150mmol/L 磷酸肌酸
√20mmol/L ATP
√2mmol/L EGTA，pH7.7
√20mmol/L $MgCl_2$
−20℃可保存数月，应避免反复冻融

增敏化学发光（ECL）溶液（单元 9.2）

溶液 A：

2.5mmol/L Luminol（氨基苯二酰肼）（Sigma）

400mmol/L p-香豆素（Sigma）

√100mmol/L Tris・Cl，pH8.5

溶液 B：

5.4mmol/L H_2O_2

√100mmol/L Tris・Cl，pH8.5

溶液 A 和溶液 B 可于 4℃保存 3 个月

临用前将等量的溶液 A 与溶液 B 混合

ECL 溶液也可以购买

增敏剂（附录 3E）

5×储存液：

25%（w/v）乙酰胺（20μl/反应；终浓度 5%）

5mol/L N，N，N-三甲基甘氨酸（甜菜碱；20μl/反应；终浓度 1mol/L）

40%（w/v）聚乙二醇（PEG）8000（20μl/反应；终浓度 8%）

10×储存液：

甘油（浓缩；10μl/反应；终浓度 10%）

20×储存液：

二甲基亚砜（DMSO；浓缩；5μl/反应；终浓度 5%）

甲酰胺（浓缩；5μl/反应；终浓度 5%）

100×储存液

1U/μl Perfect Match Polymerase Enhancer [Strategene；终浓度 1μl（1U）/反应]

10mg/ml 乙酰化牛血清白蛋白（BSA）或明胶（1μl/反应；终浓度 10μg/ml）

1～5U/μl 热稳定焦磷酸酶 [PPase；Boehringer Mannheim；终浓度 1μl（1～5U）/反应]

5mol/L 氯化四甲铵（TMAC；盐酸甜菜碱；1μl/反应；终浓度 50mmol/L）

0.5mg/ml 大肠杆菌单链 DNA 结合蛋白（SSB；Sigma；1μl/反应；终浓度 5μg/ml）

0.5mg/ml 基因 32 蛋白（Amersham Pharmacia Biotech；1μl/反应；终浓度 5μg/ml）

10%（v/v）吐温－20，Triton X-100 或乙基苯基聚乙二醇 P-40（1μl/反应；终浓度 0.1%）

1mol/L $(NH_4)_2SO_4$（1μl/反应；终浓度 10mmol/L；与不同于栖热水生菌的热稳定的 DNA 聚合酶连用）

平衡缓冲液（单元 7.3）

3g SDS

√7.4ml 2%（w/v）EDTA，pH7.0

10ml 甘油
√2ml 1.0mol/L Tris·Cl，pH8.65
0.3ml 溴酚蓝（溶于水的饱和溶液）
加水至 100ml
室温保存（可稳定数周）
最终浓度为：3%（w/v）SDS，0.4mmol/L EDTA，10%（v/v）甘油，20mmol/L Tris·Cl，pH 8.65

溴化乙锭，10mg/ml（单元 11.4）

10mg/ml 溴化乙锭溶于水，用磁性搅拌器搅拌几个小时。储存于黑瓶中，4℃可保存 2 个月。

溴化乙锭分析溶液（附录 3D）

在 89.5ml 的水中加入 10ml 10×TNE 缓冲液，用 0.45μm 的滤膜过滤，然后加入 0.5ml 1mg/ml 的溴化乙锭。

过滤以后加染料，因为溴化乙锭将粘在大部分滤膜上。

注意：溴化乙锭是危险的，在操作、储藏、处理中要戴手套并且采用适当的防护措施。

提取缓冲液（XB）（单元 12.7）

√25ml 20×XB 盐
12.5ml 2mol/L 蔗糖（终浓度 50mmol/L）；分装储存于－20℃
√5ml 1mol/L HEPES（终浓度 0.1mol/L），用 10mol/L KOH 调整 pH 至 7.7
加水至 500ml
使用当天新鲜配制

提取缓冲液（单元 13.4）

√150mmol/L NaCl
√25mmol/L Tris·Cl，pH7.4
√2%（w/v）Triton X-100（Sigma，特优级）
√1mmol/L PMSF（用异丙醇配制的 100mmol/L 储存液；也可见附录 2B）
10μg/ml 亮抑蛋白酶肽（用水配制的 1mg/ml 储存液；也可见附录 2B）
√2mg/ml BSA（组分Ⅴ；Sigma，纯度 98%）
新鲜配制，然后在冰中冷却。

提取缓冲液（单元 13.10）

PBS 中含有：
√0.5%（v/v）Triton X-100
20mmol/L NH_4OH
4℃可储存 1 个月。

提取缓冲液（用于制备去膜精子染色质）（单元 12.5）

√10mmol/L HEPES，pH7.4
√80mmol/L KCl

√15mmol/L NaCl

√5mmol/L $MgCl_2$

√1mmol/L EDTA

避光保存在 4℃。

FBS（胎牛血清）

将胎牛血清解冻（运输过程中使用干冰并在使用前一直处于冷冻状态），4℃可保存 3～4 周。若在此期限内不用，在无菌条件下小量分装并再次冷冻储存。在－20℃下可保存 1 年。FBS 热灭活就是将血清置于 56℃水浴中加热 30min 至 1h，在开始的 10～15min 内周期性轻轻晃动以保证加热均匀。

应避免反复冻融，因为这样做可能会导致血清变性。

热灭活的 FBS 具有多种用途（血清经过热处理可使补体蛋白失活从而预防针对所培养细胞的免疫反应），可以购买或在实验室如上所述制备。

纤连蛋白包被表面，预包被，二维空间（单元 13.10）

用磷酸缓冲盐溶液（PBS；见配方）配制 10mg/ml 的人血浆纤连蛋白溶液（见单元 10.5，或从 Sigma 购买），立即在每个 35mm 的组织培养皿（或其他待包被表面）中加入 1ml 此溶液，于 37℃孵育 1h，弃除多余的纤连蛋白溶液，并用 PBS 冲洗一遍。

以上过程可以用任何想用的蛋白质来包被培养皿或盖玻片，如果是可溶性混合物，所用蛋白质的浓度为 30μg/ml。

纤连蛋白包被组织培养皿（单元 13.9）

用 PBS（见配方）配制 25μg/ml 的人血浆纤连蛋白（Sigma）溶液，每个 35mm 的组织培养皿中加入 1ml 此溶液，室温孵育 1h 后弃除多余的纤连蛋白溶液，并用 PBS 冲洗一遍。在 4℃下用 PBS 封存可保存 1 个月，使用时再次冲洗。

Ficoll 铺垫溶液（单元 3.9）

5.5g 山梨醇

1.25g Ficoll 400

加水至 25ml

新鲜配制，并置于 0℃或 4℃直到使用。

Ficoll 梯度缓冲液（单元 3.9）

√10mmol/L PIPES/KOH，pH6.8

200mmol/L 山梨醇

4℃可储存几周

临用前加入 50×PIC 和 PMSF（1mmol/L；见配方）。

Ficoll-Hypaque 溶液（密度 1.07～1.08g/ml）（单元 2.2）

用 75ml 的蒸馏水溶解 6.2g Ficoll（分子质量 400 000；Sigma），缓慢搅拌，加入 10.4g 三碘苯甲酸钠，搅拌至溶液透明，加水至 100ml。用孔径 0.22μm 的滤器（Nalgene）过滤除菌。4℃避光下可保存 6 个月。也可从 Orgnon Teknika Cappel 购买淋巴细胞分离液，或从 Bio-Whittacker 购买同类产品。

Ficoll 裂解液（单元 3.9）

50%（w/v）Ficoll 裂解液：将 100ml 的 2×PM 缓冲液（见配方）及 30ml 的水加到 400ml 的烧杯中，加热到 60℃（不要沸腾），然后缓慢加入 100g Ficoll 400，连续快速搅动 5～10min。盖上玻璃培养皿，不要让溶液冷却（但要避免沸腾），持续缓慢搅动并温和加热直至 Ficoll 完全溶解（通常需要 1h）。让溶液冷却至室温，将 Ficoll 溶液转移至 250ml 的洁净玻璃缸，用水多次冲洗保证所有 Ficoll 都从烧杯转移至玻璃缸中。在所有泡沫升至表面时加水至 200ml，用石蜡封口膜和胶布小心封严。放于搅拌器上完全混匀（30～60min），用无菌 50ml 的塑料管分装储存于－20℃。解冻后注意混匀，临用前加热至室温并加入 1000×蛋白酶抑制剂混合液（1000×PIC；见配方）PIC-W 及 PIC-D，比例为 1∶1000（终浓度为 1×）。

精确配制 50%的 Ficoll 裂解储存液很关键。

20%（w/v）Ficoll 裂解液：将 40ml 50%的 Ficoll 裂解液（见配方）与 30ml 的 2×PM缓冲液（见配方）混合，加水至 100ml，临用前加热至室温并加入 1000×蛋白酶抑制剂混合液（1000×PIC；见配方）PIC-W 及 PIC-D，二者比例为 1∶1000。

30%（w/v）裂解液：将 27.0ml 50% 的 Ficoll 裂解液（见配方）与 9.0ml 的 2×PM 缓冲液（见配方）混合，加水至 45ml，临用前加热至室温并加入 1000×蛋白酶抑制剂混合液（1000×PIC；见配方）PIC-W 及 PIC-D，比例为 1∶1000（终浓度为1×）。

40%（w/v）裂解液：将 36ml 50%的 Ficoll 裂解液（见上）与 4.5ml 的 2×PM 缓冲液（见配方）混合，加水至 45ml，临用前加热至室温并加入 1000×蛋白酶抑制剂混合液（1000×PIC；见配方）PIC-W 及 PIC-D，比例为 1∶1000（终浓度为 1×）。

Ficoll 溶液（单元 3.9）

0%的 Ficoll 溶液：不含 Ficoll 的 Ficoll 梯度缓冲液（见配方）。临用前加入 50×蛋白酶抑制剂混合液（50×PIC；见配方）及 1mmol/L PMSF（来自 100mmol/L 的储存液；蛋白酶抑制剂储存液见配方）。

4%（w/v）的 Ficoll 溶液：将 4g 的 Ficoll 400 溶于 50ml 的 Ficoll 梯度缓冲液（见配方），并用 Ficoll 梯度缓冲液将最终体积调整至 100ml。临用前加入 50×蛋白酶抑制剂混合液（50×PIC；见配方）及 1mmol/L PMSF（来自 100mmol/L 的储存液；蛋白酶抑制剂储存液见配方）。

8%（w/v）的 Ficoll 溶液：将 8g 的 Ficoll 400 溶于 50ml 的 Ficoll 梯度缓冲液（见配方），并用 Ficoll 梯度缓冲液将最终体积调整至 100ml。临用前加入 50×蛋白酶抑制剂混合液（50×PIC；见配方）及 1mmol/L PMSF（来自 100mmol/L 的储存液；蛋白酶抑制剂储存液见配方）。

15%（w/v）的 Ficoll 溶液：将 15g 的 Ficoll 400 溶于 50ml 的 Ficoll 梯度缓冲液（见配方），并用 Ficoll 梯度缓冲液将最终体积调整至 100ml。临用前加入 50×蛋白酶抑制剂混合液（50×PIC；见配方）及 1mmol/L PMSF（来自 100mmol/L 的储存液；蛋白酶抑制剂储存液见配方）。

由于 Ficoll 溶解时间很长，应在实验的前一天（或更早）制备好溶液。为减少凝结成块，在搅动的同时向 Ficoll 梯度缓冲液中缓慢加入 Ficoll 400，无需加热持续搅动。一旦溶解，用 Ficoll 梯度缓冲液将最终体积调整至 100ml。过滤除菌。4℃下可保存

几周。

最终洗脱缓冲剂（单元 10.4）

√37.5ml 4mol/L NaCl（终浓度 150mmol/L）

20ml 1mol/L 三乙醇胺氯化物（TEA·Cl），pH8.6（终浓度 20mmol/L）

√10ml 0.5mol/L EDTA，pH8.0（终浓度 5mmol/L）

1.0ml Trasylol（终浓度 0.001% v/v）

2.0ml 10% NaN_3（终浓度 0.02% w/v）

用水调节体积至 1L

4℃可储存 6 个月

五因子（5F）添加剂（单元 1.2）

配制下列 200×储存液：

2mg/ml 胰岛素，溶于 10mmol/L HCl

2mg/ml 转铁蛋白，溶于 PBS

2mmol/L 乙醇胺，溶于水

2mmol/L 2-巯基乙醇，溶于水

2μmol/L 硒酸钠，溶于水

储存液过滤灭菌，用前储存于 4℃

每 100ml 培养基加 0.5ml 储存液

定影溶液，4×（单元 13.5）

40ml 浓缩的多聚甲醛溶液（见配方）

√5ml 20×PBS

0.4ml 50%（v/v）含水戊二醛（试剂级）水溶液

加水至 50ml

为了获得最好的结果，溶液应新鲜配制。如果需要，定影液能在 4℃储存 2～3 天。

用于显示核装置的固定液（单元 12.5 和 12.6）

√10mmol/L HEPES，pH7.5

200mmol/L 蔗糖

1μg/ml Hoechst 33258

1mg/ml FITC-右旋糖酐

12%（w/v）多聚甲醛

箔包裹避光储存于－20℃

用于显示核内蛋白输入的固定液（单元 12.5）

固定液 1：

√1μl 1mol/L HEPES，pH7.5（终浓度 10mmol/L）

10μl 2mol/L 蔗糖（终浓度 200mmol/L）

1μl 1mg/ml Hoechst 33258（bisbenzimide；Calbiochem；终浓度 1μg/ml）

10μl 10mg/ml 异硫氰酸荧光素-葡聚糖（FITC-葡聚糖，150 kDa，Sigma；终浓度 1mg/ml）

77μl 16% 多聚甲醛（无甲醇，Polysciences，终浓度 12%）

打开 16% 多聚甲醛瓶后，要将溶液分装，－20℃储存

固定液 2：（用于预先已固定样品）

√10mmol/L HEPES，pH7.5

200mmol/L 蔗糖

1μg/ml Hoechst 33258

1mg/ml FITC-葡聚糖

3.7%（w/v）多聚甲醛

－20℃箔包装储存

固定液（单元 7.6）

将 50ml 的甲醇与 12ml 的冰乙酸混合，加水至 100ml。加 50μl 37%的甲醛。使用前新鲜制备。

注意：冰乙酸和甲醇具挥发性且有毒，甲醛有毒且有致癌性，请戴手套并在化学通风橱中操作。

固定液（单元 7.6）

在 50ml 聚丙烯锥形管中混合下列物质：

2g 蔗糖

10ml 16%（w/v）多聚甲醛（EM 级；Electron Microscopy Sciences）

加 PBS 至 40ml

用前新鲜配制

5-氟脱氧尿嘧啶核苷（FrdU），1mg/ml（4mmol/L）（单元 11.3）

10mg FrdU 溶于 10ml 水，用孔径 0.45μm 的滤器过滤除菌。分装，－20℃可储存 6 个月。

甲醛溶液（单元 11.3）

3.7%（v/v）甲醛

√2%（w/v）蔗糖溶于 PBS（PBS 见配方）

新鲜配制

甲酰胺填充缓冲液（FLB）（单元 12.9）

80%（v/v）甲酰胺

√10mmol/L EDTA

1mg/ml 二甲苯蓝

－20℃可储存 6 个月

冷冻缓冲液（单元 12.9）

√50mmol/L Tris·Cl，pH7.9

30%（v/v）甘油

√1mmol/L EDTA

√0.5mmol/L DTT

在 4℃新鲜配制

冷冻培养基（单元 2.2）

将 20ml Iscov 改良的 Dulbecco 培养基（IMDM；Life Technologies）与 20ml 肝素化的人血浆混合，冷却至 4℃，缓慢加入 10ml 的二甲基亚砜，每加一些都要混合均匀。冷却至 4℃后用 0.22μm 的滤器过滤除菌。

G418 溶液，20mg/ml（单元 14.5）

用 10mmol/L HEPES 配制 20mg/ml 的 G418 溶液，pH7.2（见配方），用 0.22μm 的滤器过滤除菌。分装成 0.5ml，储存于 −20℃。

明胶包被组织培养皿（单元 13.9）

用 PBS 制备 0.2%（w/v）的明胶溶液（见配方），高压灭菌，冷却，用 0.22μm 的滤器过滤。每个 10cm 的培养皿中加入 5ml 的明胶溶液，在 4℃孵育 3h 以上。除去明胶溶液，用 10ml 的 PBS 冲洗一遍。用 PBS 封住，4℃可保存 1 个月。用之前再次冲洗。

明胶包被组织培养瓶和培养板（单元 2.3）

用 PBS（Life Technologies；见配方）配制 0.1%（w/v）的明胶溶液，过滤除菌（4℃可以保存 1 个月），于 37℃用明胶溶液孵育培养瓶 30min，而后除去明胶溶液，用无菌的 PBS 冲洗一遍。将包被过的培养瓶在 4℃下储存 1 天或风干，1 周内使用。

明胶溶液，0.2%（w/v）（单元 13.10）

用 PBS（见配方）配制 0.2%的明胶溶液，高压灭菌，冷却，用 0.22μm 的滤器过滤。4℃可保存 1 年。

明胶溶液，8.7mg/ml（单元 13.12）

向 1mol/L Tris・Cl 中加入明胶（牛皮肤，Sigma-Aldrich B6-6296 型），pH8.8，8.7mg/ml。

加热至 57℃溶解，而后用 Whatman 1 号滤纸过滤。

凝胶脱色溶液（单元 13.12）

30%（v/v）甲醇
10%（v/v）乙酸
60%（v/v）水
室温可储存 1 年

凝胶洗涤缓冲液 1～4（单元 13.12）

缓冲液 1：
2.5%（v/v）Triton X-100
√ 3mmol/L NaN_3
缓冲液 2：
2.5%（v/v）Triton X-100
√ 50mmol/L Tris・Cl，pH7.5
√ 3mmol/L NaN_3
缓冲液 3：
2.5%（v/v）Triton X-100
√ 50mmol/L Tris・Cl，pH7.5

√3mmol/L NaN_3
√5mmol/L $CaCl_2$
1μmol/L $ZnCl_2$
缓冲液 4：
√50mmol/L Tris・Cl，pH7.5
√3mmol/L NaN_3
√5mmol/L $CaCl_2$
1μmol/L $ZnCL_2$
缓冲液在室温下也许可储存 1 年。

通用匀浆基液（GHM）（单元 3.6）

在 100ml 水中加入：
17.1g 蔗糖（终浓度 0.25mol/L）
√2.0ml 100mmol/L Na_2EDTA（终浓度 1mmol/L）
√2.0ml 1mol/L Tris・Cl（终浓度 10mmol/L）
调整 pH 至 7.4，加水至 200ml
4℃可储存 1～2 天

新霉素（G418）（单元 10.4）

以 200mmol/L 的 HEPES（钠盐）配制 100mg/ml 的 G418 储存液，pH7.9，过滤除菌，－20℃或－80℃保存。对于每一批新产品（新批号的 G418 粉剂），通过绘制杀伤曲线图定出有效杀细胞的浓度（即用不同浓度的 G418 作用于细胞，确定 14 天内杀死培养皿中所有细胞所需的最小药物浓度）。

有关 G418 的更多内容，见附录 2B。

姬姆萨染液（单元 14.1）

4ml 95%（v/v）乙醇
3ml 姬姆萨储存液（Ricca Chemical）
√43ml 15mmol/L 磷酸钠或磷酸钾缓冲液，pH6.8
使用前新鲜配制

玻璃粉（用于麦胚提取物的制备）（单元 12.1）

将玻璃粉（Sigma）悬于至少 20 倍体积的水中，每升液体中加入 1ml 的 DEPC，将容器盖上但不要盖严，置室温下搅拌过夜。高压灭菌 45min。待玻璃粉沉淀下来后除去上清，置于 185℃的烤箱中烤干。

谷胱甘酞珠，洗过（单元 9.3）

将 50ml 冰冷的 PBS（见配方）加至 3ml 谷胱甘肽珠中，在 4℃，2000*g* 的条件下离心 5min，去掉上清，重复离心 3 次，每次加入 50ml 冰冷的 PBS。

谷胱甘酞/Tris（单元 12.4）

√2.5ml 1mol/L Tris・Cl，pH8.0（终浓度 50mmol/L）
加水至 45ml
76.8g 还原型谷胱甘肽（Sigma；终浓度为 5mmol/L）室温下用 NaOH 调整 pH 为 8.0

加水至 50ml

等量分装

于－20℃冻存，可保存数月。

谷胱甘肽显著改变 Tris 缓冲液的 pH，从而严重影响一些蛋白质的洗脱。

甘氨酸凝胶缓冲液，4×(200mmol/L 甘氨酸，pH8.6～10.6)（单元 7.2）

15.01g 甘氨酸

加水至 500ml

用 1mol/L NaOH 调整 pH 至 8.6～10.6

加水至 1000ml

4℃可储存 1 个月。

盐酸胍裂解缓冲液（单元 11.5）

114.6g 盐酸胍（Sigma；终浓度 6mol/L）

√50ml 1mol/L Tris·Cl，pH8.5，21℃（终浓度 250mmol/L）

√4ml 0.5mol/L EDTA，pH7.4（终浓度 10mmol/L）

终体积为 200ml

室温储存无限期。

Ham F12 营养培养基

见表 A.1.2.

HAT 添加剂，100×

10mmol/L 次黄嘌呤钠

40μmol/L 氨基喋呤

1.6mmol/L 胸腺嘧啶脱氧核苷

4℃避光保存

使用前水化并加入培养基至 1×终浓度

提示：此补充物危险，避免从口吸入或接触皮肤。

HB1B 缓冲液（单元 9.3）

√20mmol/L HEPES，pH7.7

√50mmol/L NaCl

√0.1mmol/L EDTA

√25mmol/L $MgCl_2$

√0.05%（v/v）Triton X-100

4℃储存 2 个月

HBSS（Hanks 平衡盐溶液）

0.40g KCl（终浓度 5.4mmol/L）

0.09g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$（终浓度 0.3mmol/L）

0.06g KH_2PO_4（终浓度 0.4mmol/L）

0.35g $NaHCO_3$（终浓度 4.2mmol/L）

0.14g $CaCl_2$（终浓度 1.3mmol/L）

0.10g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$（终浓度 0.5mmol/L）
0.10g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$（终浓度 0.6mmol/L）
8.0g NaCl（终浓度 137mmol/L）
1.0g D-葡萄糖（终浓度 5.6mmol/L）
0.2g 酚红（0.02%；可选用）
加水至 1L，用 1mol/L HCl 和 1mol/L NaOH 调整 pH 至 7.4
过滤除菌，4℃可储存 1 个月

可以购买或自己配制无 Ca^{2+}、Mg^{2+} 的 HBSS（CMF-HBSS）。这些成分可以选用，通常对实验没有影响，但有少数例外，它们的存在可能有损害。这时可以参考各种方案，以确定是否应该使用这种成分。

瓶子应该盖紧以防止 CO_2 逸出导致溶液碱性化。

HCl，1mol/L

按以下顺序混合：
913.8ml 水
86.2ml 浓盐酸

HCl/Triton X-100（单元 11.3）

17.4ml 11.5mol/L HCl（终浓度 2mol/L）
0.5g Triton X-100（终浓度 0.5% w/v）
82ml 双蒸馏水
新鲜配制

复原溶液（单元 14.5）

√100mmol/L $CaCl_2$
√100mmol/L $MgCl_2$
0.22μm 的滤器过滤除菌
4℃可储存 6 个月

心脏清洗缓冲液（单元 3.5）

在 500ml 水中加入：
85.5g 蔗糖（终浓度 0.25mol/L）
√10ml 1mol/L Tris·Cl（终浓度 10mmol/L）
调整 pH 至 7.8
加水至 1L
4℃可储存 1～2 天

热变性的 BSA 溶液，10mg/ml（单元 13.1 和 13.4）

用 15ml 的聚苯乙烯管将 BSA 溶于不含二价阳离子的 Dulbecco PBS（CMF-DPBS；Life Technologies；见配方），浓度为 10mg/ml。用孔径 0.22μm 的滤器过滤除去未溶解的蛋白质，在 85℃的水浴中孵育 10～12min，然后冷却至室温，当天使用。

此举主要目的是为制备含 BSA 微粒的溶液，可以有效地包被塑料。这种溶液呈轻微浑浊状，若是清澈，说明没有足够的 BSA 颗粒，若呈白色则说明颗粒过大。待溶液

冷却后即可使用。

热变性的 BSA 可能对某些细胞类型有毒。

HeBS（HEPES 缓冲盐溶液）溶液，2×

16.4g NaCl

11.9g HEPES 酸

0.21g Na_2HPO_4

800ml 水

用 5mol/L NaOH 滴定至 pH7.05

加水至 1L

0.45μm 滤器过滤消毒

50ml 分装，−20℃储存

溶液用于转染时，pH 应在 7.05～7.12 并检测转染效率。

含 0.1mol/L KCl 的 HEMG（单元 12.9）

√25mmol/L HEPES（钾盐），pH7.6

√100mmol/L KCl

√12.5mmol/L $MgCl_2$

√0.1mmol/L EDTA

10%（v/v）甘油

4℃可储存 1 个月

临用前加入：

√1.5mmol/L DTT

1mmol/L 偏亚硫酸氢钠

√0.1mmol/L PMSF（亦见附录 2B）

1mmol/L 苯甲脒

含 0.1mol/L KCl 的 HEMG20（单元 12.9）

√25mmol/L HEPES（钾盐），pH7.6

√100mmol/L KCl

√12.5mmol/L $MgCl_2$

√0.1mmol/L EDTA

20%（v/v）甘油

4℃可储存 1 个月

临用前加入：

√1.5mmol/L DTT

1mmol/L 偏亚硫酸氢钠

√0.1mmol/L PMSF（亦见附录 2B）

1mmol/L 苯甲脒

制备“核液”时，可用 0.4mol/L 谷氨酸钾・H_2O（Sigma）代替 0.1mol/L KCl。

氯高铁血红素，1mmol/L（单元 12.1）

65mg 氯高铁血红素（Sigma）

2ml 100mmol/L KOH

√足量 100mmol/L Tris·Cl，pH8.7，调整 pH 至 7.8

而后加入：

20ml 无菌水

80ml 乙二醇

储存于不透光的瓶子，−20℃可储存 2 年

肝素酶 III 缓冲液（单元 13.11）

1.36g 乙酸钠（终浓度 0.1mol/L）

0.000 158g 乙酸钙（最终浓度 0.01mmol/L）

1g 卵清蛋白（终浓度 1% w/v）

0.005g 亮抑蛋白酶肽（终浓度 50μg/ml）

0.0157g 苯甲脒·Cl（终浓度 1mmol/L）

加水至 90ml

用 1mol/L 乙酸调节 pH 至 7.0

√加入 100μl 用乙醇配制的 0.2mol/L 苯甲磺酰氟（PMSF；见配方），同时迅速涡旋混匀防止沉淀（终浓度 0.2mmol/L）

√加 100μl TritonX-100（对于疏水蛋白聚糖；浓度 0.1% v/v）

缓慢搅动直到 Triton 溶解

加水至 100ml，4℃可储存 2 天

HEPES，1mol/L，pH 7.4（单元 11.5）

23.8g HEPES 溶于 50ml 水，用 5mol/L KOH 调整 pH 至 7.4，加水至 100ml，4℃无限期储存。

HEPES 缓冲液（单元 13.3）

√1L HCMF

√1ml 1mol/L $CaCl_2$

√1ml 1mol/L $MgCl_2$

用孔径 0.45μm 的滤器过滤，去除所有杂质

4℃可储存数月

HEPES 缓冲液，不含 Ca^{2+}、Mg^{2+}（HCMF），pH 7.4（单元 13.3）

8g NaCl（终浓度 0.137mol/L）

0.4g NaCl（终浓度 5.4mmol/L）

0.12g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$（终浓度 0.34mmol/L）

1.0g 葡萄糖

2.38g N-2 羟乙基哌嗪-N′-2-乙磺酸（HEPES；终浓度 10mmol/L）

加水至 1L

用 1mol/L NaOH 调整 pH 至 7.4

用孔径 0.45μm 的滤器过滤，去除所有杂质

4℃可储存数月

HEPES 缓冲液，不含 Mg^{2+}（HMF）（单元 13.3）

√1L HCMF

√1ml 1mol/L $CaCl_2$

用孔径 0.45μm 的滤器过滤，去除所有杂质

4℃可储存数月

HEPES 缓冲盐溶液（HeBS），pH7.05（单元 10.4）

要制备 500ml 的 HeBS，加 2.5g 的 HEPES（终浓度为 20mmol/L）至 DBPS 中，用 5mol/L NaOH 将 pH 调至 7.05。

HEPES/CHAPS 缓冲液（单元 11.5）

在 450ml 水中加入：

2.98g HEPES（终浓度为 25mmol/L）

用 10mol/L NaOH 调至 pH7.5

加入 0.77g 二硫苏糖醇（DDT）

500mg 3-[(3-胆酰胺丙基）-二甲胺] -1-丙烷磺酸（CHAPS；终浓度 0.1%）

加水至 500ml

在 4℃可保存 2 个月

临使用前，每 1ml 缓冲液加入：

100U 抑蛋白酶肽（Bayer）

√10μl 100mmol/L PMSF

HEPES/KAc 裂解缓冲液（单元 3.9）

√20mmol/L HEPES/KOH，pH6.8

50mmol/L 乙酸钾

200mmol/L 山梨醇

√1mmol/L EDTA

高温高压消毒，4℃可储存 1 个月

临用前，按所需量将 HEPES/KAc 裂解缓冲液分装至试管中。加入 500×蛋白酶抑制剂混合液 A 和 B（PIC-A 和 PIC-B，见配方），终浓度为 1×。加 1mmol/L PMSF 和 5μg/ml α-巨球蛋白（终浓度；蛋白酶抑制剂混合液储存液 A，见配方）。若有需要，加 DTT 至终浓度 1mmol/L，而不加巨球蛋白。

HEPES-KOH，pH7.2，1mol/L（单元 12.1）

238.3g HEPES，游离酸

加水至 800ml

用 10mol/L 的 KOH 调节 pH 至 7.2

加水至 1L

过滤除菌

1ml 分装，−20℃可储存 2 年

HEPES 裂解缓冲液（单元 3.9）

√20mmol/L HEPES/KOH，pH6.8

50mmol/L 乙酸钾

100mmol/L 山梨醇

√2mmol/L EDTA

高温高压消毒，4℃可储存 1 个月

临用前加入 DTT 和蛋白酶抑制剂，终浓度为 1mmol/L DTT，1mmol/L PMSF，1μg/ml 抑胃肽酶，1μg/ml 亮抑蛋白酶肽（蛋白酶抑制剂储存液 B 见配方）。

高密度稀释剂（HD）（单元 3.7）

在 100ml 水中加入：

√2ml 100mmol/L Na_2EDTA（终浓度 1mmol/L）

√10ml 100mmol/L MOPS（终浓度 5mmol/L）

0.2ml 乙醇（终浓度 0.1% v/v）

用 1mol/L 的 NaOH 调节 pH 至 7.4

加水至 200ml

4℃可保存 1～2 天

高 NaCl 缓冲液（HNB）（单元 3.8）

在 100ml 水中加入：

23.4g NaCl（终浓度 2.0mol/L）

√40μl 1mol/L $MgCl_2$（终浓度 0.2mmol/L）

√2ml 1mol/L Tris · Cl（终浓度 10mmol/L）

如果需要，调节 pH 至 7.4

加水至 200ml

在 4℃可保存 2～3 天

临用前加入 1ml 200mmol/L PMSF（见配方）

高盐缓冲液（单元 12.9）

√50mmol/L Tris · Cl，pH7.5

10%（w/v）蔗糖

√0.42mol/L KCl

√5mmol/L $MgCl_2$

√0.1mmol/L EDTA

20%（v/v）甘油

4℃可保存 1 个月

临用前加入：

√2mmol/L DTT

√0.2mmol/L PMSF（亦见附录 2B）

1mmol/L 苯甲脒

如果需要，高盐缓冲液中的 0.42mol/L KCl 可以用 0.42mol/L NaCl 代替。

L-组氨醇，50mmol/L（单元 13.5）

535mg L-组氨醇 · 2HCl（Sigma）溶于 50ml 100mmol/L HEPES 中，pH7.4。用

0.22μm 的滤膜过滤，分装，－20℃可保存 1 年。

组蛋白 H1 溶液（单元 11.3）

10mg/ml 小牛胸腺组蛋白 H1（Boehringer Mannheim）

√10mmol/L $NaPO_4$，pH7.2

分装，－20℃可保存 1 年

HL5 培养基（单元 14.5）

10g 葡萄糖（终浓度 55mmol/L）

10g Difco 蛋白胨（终浓度 1% w/v）

5g 酵母提取物（终浓度 0.5% w/v）

0.95g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$（终浓度 3.5mmol/L）

0.5g KH_2PO_4（终浓度 3.7mmol/L）

0.03g 双氢链霉素（终浓度 41μmol/L）

加水至 1L

最终 pH6.5

混合所有的成分，分装入玻璃瓶和烧瓶。用棉布塞塞住烧瓶口。液体循环式高压灭菌 20min。22℃可储存 1 个月。

高压灭菌时间过长可致葡萄糖变焦（培养基变黑）从而影响细胞生长。

Hoechst 33258 分析液（附录 3D）

储存液：溶解 Hoechst 33258 于水中，浓度为 1mg/ml。在 4℃条件下可保持稳定约 6 个月。

工作液：加 10ml 10×的 TEN 缓冲液（见配方）至 90ml 的水中，以 0.45μm 的滤器过滤，然后加入 10μl 1mg/ml 的 Hoechst 33258。

Hoechst 33258 为一种荧光染料，相对分子质量为 624，在 338nm 处的摩尔消光系数为 4.2×10^4 mol/L/cm。

过滤后再加染料，因为这种染料可粘附于滤膜上。

注意：Hoechst 33258 是危险品，在操作、储存以及处置过程中采取适当的防护措施。

Hoechst 33342 储存液（单元 13.10）

配制 2mmol/L Hoechst 33342 溶液（bisbenzimide H33342 荧光染料 · 3HCl；Calbiochem；分子质量 615.9g），避光保存，在 4℃可保存 6 个月。

匀浆缓冲液（单元 9.2 和 9.3）

50mmol/L β-磷酸甘油，pH7.3

√1.5mmol/L EGTA

√1.0mmol/L EDTA

0.1mmol/L 钒酸钠

1.0mmol/L 苯甲脒

10μg/ml 抑蛋白酶肽

√10μg/ml 亮抑蛋白酶肽

√2.0μg/ml 抑胃肽酶 A

√1.0mmol/L DTT

不加 DTT 在 4℃可保存 3 个月

临用前加 DTT

应特别注意缓冲液成分的均一化。作者建议使用β-磷酸甘油，既可以当缓冲液又可以作为一般磷酸酶抑制剂，比 Tris 和 HEPES 优越。原钒酸钠用来抑制酪氨酸磷酸酶，抑胃肽酶 A、抑蛋白酶肽、亮抑蛋白酶肽及苯甲脒混合物用来抑制蛋白酶。冰冷匀浆缓冲液能够阻断大多数细胞提取物中的磷酸酶及蛋白酶的活性。

匀浆缓冲液（单元 12.4）

混合下列物质配制 10×储存液：

√200ml 1mol/L HEPES，pH7.3（用 KOH 调节 pH）

20ml 1mol/L 乙酸镁，pH7.3

加水至 1L

用 0.2μm 滤膜过滤除菌

4℃可保存几个月

使用当天配制 1×工作液：

用水将 10×储存液稀释至 1×

加1mol/L 二硫苏糖醇（DDT）储存液（在 −20℃ 分装冷冻保存）至终浓度 2mmol/L

匀浆缓冲液（单元 13.4）

√150mmol/L NaCl

√25mmol/L，Tris・Cl，pH7.4

0.005%（w/v）毛地黄皂苷

4℃可保存 3 个月

匀浆缓冲液 I（单元 12.3）

√20mmol/L HEPES 酸，pH7.4

375mmol/L 山梨醇

−20℃可保存 6 个月

匀浆缓冲液 II（单元 12.3）

√10mmol/L Tris・Cl，pH7.4

0.5mol/L 蔗糖

√5mmol/L EDTA

√5mmol/L EGTA

√1×PIC

新鲜配制

匀浆基液（HM）（单元 3.3）

在 100ml 水中加入：

17.1g 蔗糖（终浓度 0.25mol/L）

√2ml 1mol/L Tris · Cl，pH7.4（终浓度 10mmol/L）

如果需要，用 1mol/L Tris 或 1mol/L HCl 调节 pH 至 7.4

加水至 200ml

4℃可保存 1～2 天

匀浆基液（HM）（单元 3.4）

在 100ml 水中加入：

17.1g 蔗糖（终浓度 0.25mol/L）

√2ml 100mmol/L Na_2EDTA（终浓度 1mmol/L）

√20ml 100mmol/L HEPES（终浓度 10mmol/L）

用 NaOH 调节至 pH7.4

加水至 200ml

4℃可保存 1～2 天

匀浆基液（HM）（单元 3.7）

在 100ml 水中加入：

17.1g 蔗糖（终浓度 0.25mol/L）

√2ml 100mmol/L Na_2EDTA（终浓度 1mmol/L）

√10ml 100mmol/L MOPS（终浓度 5mmol/L）

0.2ml 乙醇（终浓度 0.1% v/v）

用 1mol/L NaOH 调节至 pH7.2

加水至 200ml

4℃可保存 1～2 天

HPLC 跑样缓冲液（单元 13.11）

13.6g KH_2PO_4缓冲液，pH6.0（终浓度 0.1mol/L）

29.2g NaCl（终浓度 0.5mol/L）

2g Zwittergent（Aldrich；终浓度 0.2% w/v）

加水至 1L

4℃可保存 1 个月

HTYE（HEPES/胰酶解酪蛋白/酵母提取物）肉汤（单元 1.5）

5.0g 胰酶解酪蛋白蛋白胨（BBL）

2.0g 酵母提取物

4.0g HEPES 酸

加水至 1L

用 NaOH 调节至 pH7.1±0.1

按需要分装

121℃高压灭菌 15min

4～8℃可保存 6～9 个月

HUVEC 培养基（单元 2.3）

√500ml RPMI-1640 培养基

100ml 确定离子补充的小牛血清（HyClone）

100mg 内皮细胞生长添加剂（ECGS；Collaborative Biomedical）

2500U 肝素

5ml 100×谷氨酰胺

5ml 100×青霉素/链霉素

5ml 100×两性霉素

0.5ml l000×庆大霉素

4℃可储存 1 个月

羟胺，1.5mol/L，pH8.0（单元 4.4）

4.2g 羟胺·HCl

25ml 水

5mol/L NaOH 调 pH 至 8.0

加水至 40ml

新鲜制备

羟胺·HCl，1.5mol/L，pH8.5（单元 12.4）

将 2.1g 羟胺·HCl 溶于 10ml 水，用 5mol/L NaOH 调 pH 至 8.5，水定容至 20ml。新鲜制备。

高渗缓冲液（HB）（单元 3.3）

在 100ml 水中加入：

41g 蔗糖（终浓度 0.6mol/L）

√20ml 100mmol/L HEPEPS（终浓度 10mmol/L）

用 NaOH 调节 pH 至 7.8

加水至 200ml

4℃可储存 1～2 天

低渗缓冲液（单元 12.9）

√10mmol/L Tris·Cl，pH7.9

√10mmol/L KCl

√0.1mmol/L EDTA

√0.1mmol/L EGTA

4℃可储存 1 个月

临用前加入：

√2mmol/L DTT

√0.2mmol/L PMSF（亦见附录 2B）

1mmol/L 苯甲脒

2μg/ml 抑蛋白酶肽

√2μg/ml 亮抑蛋白酶肽

0.75mmol/L 精脒

0.15mmol/L 精胺

√2μg/ml 抑胃肽酶

IB（单元 12.7）

1.852g 谷氨酸钾（终浓度 50mmol/L）

15mg 游离谷氨酸（终浓度 0.5mmol/L）

20.4μl 4.9mol/L $MgCl_2$（Sigma；终浓度 0.5mmol/L）

加水至 200ml

过滤除菌

50ml 分装，－20℃无限期储存

IEF 考马斯蓝储存液（单元 7.6）

将 0.2%（w/v）考马斯亮蓝 R-250 和 60%（v/v）甲醇溶于水，室温下可储存 4 个月。

IEF 溶解缓冲液（单元 7.4）

5.7g 尿素

√2.0ml 10%（v/v）Triton X-100

0.2ml 两性电解质，pH3.5～10.0

0.5ml 2-巯基乙醇

加水至终体积 10ml

样品中可能要加溴酚蓝，终浓度为 0.01%（w/v），这样可提高蛋白质上样和覆盖过程中的可见度。也可将其加入到覆盖溶液中。

免疫沉淀清洗缓冲液（单元 9.1）

√RIPA 裂解缓冲液

√1mmol/L DTT，新鲜加入

可使用保存在－20℃的 1mol/L DTT 储存液。

免疫沉淀缓冲液（单元 12.3）

√20mmol/L HEPES 酸，pH7.4

√150mmol/L 乙酸钾

0.25mol/L 蔗糖

√0.1%（w/v）BSA

用储存液新鲜制备，4℃可储存 1 周

输入反应混合物（单元 12.4）

约 10mg/ml 非洲爪蟾卵巢细胞胞质溶胶（见支持方案 1）

0.5 mmol/L GTP：从 20mmol/L GTP 储存液中取出加入转移缓冲液（TB；见配方）

1mmol/L ATP：从 20mmol/L ATP 储存液中取出加入转移缓冲液（TB；见配方）

输入底物（大致的浓度见支持方案 2～3）

√转移缓冲液（TB）40μl

临用前混合并置于冰上

20mmol/L ATP 和 GTP 储存液分装冻于－80℃。

孵育缓冲液（IB）（单元 3.8）

100ml 水中加入：

√40μl 1mol/L $MgCl_2$（终浓度 0.2mmol/L）

√2ml 1mol/L Tris・Cl（终浓度 10mmol/L）

如果需要，调节 pH 到 7.4

加水至 200ml

4℃可储存 2～3 天

临用前加入 1ml 200mmol/L PMSF（见配方）

孵育溶液（单元 13.12）

√50mmol/L Tris・Cl，pH7.4

√0.2mol/L NaCl

√5mmol/L $CaCl_2$

0.02%（w/v）Brij-35

4℃可储存 1 年

Iodixanol，50%（w/v）（单元 3.8）

以 1 体积用于核的 OptiPrep 稀释液（ODN；见配方）稀释 5 体积的 OptiPrep（60%iodixanol；Axis-Shied；Accurate Chemical）。4℃可储存 2～3 天。

Iodixanol 梯度溶液 A、B 和 C（单元 3.7）

按下列体积比混合已知储存液，从而得到这些梯度溶液：

OptiPrep（60% iodixanol；Life Techmologies，Accurate Chemical，Scientific，Sigma 及 Aldrich 的产品均可用）

稀释基质（DM；见配方）

1mol/L 蔗糖（见配方）

梯度溶液 A（50% w/v Iodixanol）：

5 体积 OptiPrep

0.6 体积 DM

0.4 体积 1mol/L 蔗糖

梯度溶液 B（40% w/v Iodixanol）：

4 体积 OptiPrep

0.6 体积 DM

0.7 体积 1mol/L 蔗糖

0.7 体积水

梯度溶液 C（20% w/v Iodixanol）：

2 体积 OptiRrep

0.6 体积 DM

1.1 体积 1mol/L 蔗糖

2.3 体积水

Iodixanol 梯度溶液，30%和 35%（动物细胞或组织）（单元 3.8）

配制 30%和 35%Iodixanol，可分别按照 6：4 和 7：3 的体积比，用 NIM（见配方）

稀释 50%Iodixanol（w/v）（见配方）而得到，4℃可储存 2～3 天。

Iodixanol 梯度溶液，25%和 40%（麦胚）（单元 3.8）

配制 25%和 40%的 Iodixanol，可分别按照 2.5∶3.5 和 4∶2 的体积比，用 WGM（见配方）稀释 OptiPrep（60%Iodixanol；Axis-Shield；Accurate Chemical）而得到，4℃可储存 2～3 天。

p-碘硝基四唑紫（INT）溶液（单元 3.6）

25mg INT（终浓度 2.5mg/ml）
√磷酸缓冲液，pH7.4，加至 10ml
－20℃可储存 2～3 个月

JNK 激酶缓冲液（单元 9.3）

√20mmol/L HEPES，pH7.7
√20mmol/L $MgCl_2$
20mmol/L β-磷酸甘油
0.1mmol/L 正钒酸钠
√2mmol/L 二硫苏糖醇（DTT），新鲜加入

KCl，1mol/L

74.6g KCl
加水至 1L

KCl/10mmol/L $MgCl_2$（K/Mg），2mol/L（单元 12.1）

14.9g KCl
0.214g $MgCl_2$
加水至 100ml
高压蒸汽灭菌
1ml 分装，－20℃可储存 1 年

K-EDTA，0.1mol/L，pH7.4（单元 11.5）

3.72g $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$
50ml 水
1mol/L KOH 调 pH 至 7.4
加水至 100ml
室温保存无限期

KHM 缓冲液，完全（单元 11.5）

√50ml 不完全 KHM 缓冲液
√50μl 100mmol/L PMSF（终浓度 0.1mmol/L）
50μl 20mmol/L 细胞松弛素 B（终浓度 20μmol/L）
500μl 100mmol/L Na_3VO_4（终浓度 1mmol/L）
√50μl 1000×CLAP（终浓度 1×）
临用前于冰上配制

KHM 缓冲液，不完全（单元 11.5）

√5ml 1mol/L HEPES，pH7.4（终浓度 50mmol/L）

√2.5ml 2mol/L KCl（终浓度 50mmol/L）

√2ml 0.5mol/L EGTA，pH7.4（终浓度 10mmol/L）

√100μl 2mol/L $MgCl_2$（终浓度 2mmol/L）

加水至 100ml

4℃保存无限期

激酶缓冲液（单元 9.2 和 9.3）

50mmol/L β-磷酸甘油，pH7.3

√1.5mmol/L EGTA

√1.0mmol/L EDTA

0.1mmol/L 钼酸钠

√0.1mmol/L 二硫苏糖醇（DTT）

不加 DTT 可在 4℃储存 3 个月

临用前加入 DTT

激酶缓冲液（单元 11.3）

√250μl 1mol/L Tris·Cl，pH7.5（终浓度 25mmol/L）

√300μl 5mol/L NaCl（终浓度 150mmol/L）

√100μl 1mol/L $MgCl_2$（终浓度 10mmol/L）

√100μl 0.1mol/L 二硫苏糖醇（DTT；终浓度 1mmol/L）

分装，－20℃可储存 6 个月

激酶缓冲液，10×（单元 12.6 和 12.7）

√200mmol/L HEPES，pH7.3

√5mmol/L EGTA

√10mmol/L $MgCl_2$

4℃可长期储存，直到变浑浊为止

KPM 缓冲液，完全（单元 11.5）

√50ml 不完全 KPM 缓冲液

√50μl 100mmol/L PMSF（终浓度 0.1mmol/L）

50μl 20mmol/L 细胞松弛素 B（终浓度 20μmol/L）

500μl 100mmol/L Na_3VO_4（终浓度 1mmol/L）

√50μl 1000×CLAP（终浓度 1×）

临用前配制，置于冰上

KPM 缓冲液，不完全（单元 11.5）

√5ml 1mol/L PIPES，pH7.0（终浓度 50mmol/L）

√2.5ml 2mol/L KCl（终浓度 50mmol/L）

√2ml 0.5mol/L EGTA，pH7.0（终浓度 10mmol/L）

√100μl 2mol/L $MgCl_2$（终浓度 2mmol/L）

加水至 100ml
4℃保存无限期

标记缓冲液（单元 12.7）

40ml 丙三醇（终浓度 40% v/v）
2.38g HEPEPS，游离酸（终浓度 0.1mol/L）
20μl 4.9mol/L $MgCl_2$（终浓度 1mmol/L）
√200μl 0.5mol/L EGTA（终浓度 1mmol/L）
20ml 水
10mol/L NaOH 调节 pH 至 8.6。加水至 100ml。过滤除菌。4℃可储存 6 个月。

标记垫层（单元 12.7）

60ml 丙三醇（终浓度 60% v/v）
√20ml 0.5mol/L HEPEPS（终浓度 0.1mol/L）
20μl 4.9mol/L $MgCl_2$（终浓度 1mmol/L）
√200μl 0.5mol/L EGTA（终浓度 1mmol/L）
10mol/L NaOH 调 pH 至 8.6
加水至 100ml
过滤除菌
4℃可储存 6 个月

标记培养基（单元 8.2）

无糖培养基的配方见表 8.2.2。它们分别用于放射性糖、硫酸盐、磷酸盐的标记。配制这些培养基时，将液体成分加入水中（最终体积的 80%），再加入干粉成分，搅拌使其溶解。用 25mmol/L 的碳酸氢钠还是 20mmol/L 的 HEPES 作为缓冲液取决于培养的环境是否有 CO_2。钙及镁盐会形成不溶性沉淀，所以在其他盐全部溶解后再加入。若有需要，可以加入浓缩液体形式的抗生素和抗真菌制剂（如青霉素和链霉素）。以 1mol/L 的 HCl 或 1mol/L NaOH 调整 pH 至 7.1～7.2，并加水至 500ml。由于此培养基是由不同的成分配制而成，与大多数干粉培养基相比，初始的 pH 可能与期望值相差甚远，用孔径 0.2μm 的瓶口型滤器过滤除菌，分装至 100ml 无菌瓶子里。4℃可储存 3 个月。

通常是通过在培养基里降低前体物质及相关成分的浓度，来进行放射性前体物质的标记。某些不完全培养基可以购买，这些培养基也可用标准化学物质和液体的浓缩 MEM 进行配制，大多数组织培养基供应商出售的培养基都可用（如 Life Technologies，Sigma-Aldrich）。其他试剂也应该是组织培养专用的。

乳过氧化物酶缓冲液（单元 8.4）

将 16.8ml 的 PBS（见配方）、1ml 0.5mol/L 的 NaH_2PO_4 pH7.6（见配方）与 2.2ml 的水混合。4℃可长期储存，但注意不要污染，长时间储存后要检测 pH 并调整至所需值。

这种缓冲液是一种添加了磷酸钠的 PBS 缓冲液。

乳过氧化物酶溶液（单元 8.4）

溶解 1.5mg 乳过氧化物酶（Sigma 或 Calbiochem）于乳过氧化物酶缓冲液中（见

配方)，以 50μl 或 250μl 的量分装，－70℃储存，使用前只能解冻一次。

LB/氨苄青霉素琼脂板（单元 13.5）

通过高压灭菌将 15g 细菌培养用琼脂溶于 1L 的 LB 培养基（见配方）中，冷却至 50℃，加 1ml 50mg/ml 的氨苄青霉素，混匀，倒入 10cm 的聚苯乙烯平皿中。室温过夜后于 4℃避光保存。

LB 培养基

每升含：

10g 胰蛋白胨

5g 酵母提取物

5g NaCl

1ml 1mol/L NaOH

高压灭菌 25min

即使 pH 用 NaOH 调整到 7.0，培养基也没有很高的缓冲能力。在培养过程中当培养物接近饱和时，pH 会下降。

高压灭菌后，培养基也可以加入抗生素（如 50μg/ml 的氨苄青霉素，12μg/ml 的四环素)、半乳糖苷（如 20μg/ml Xgal，0.1mmol/L IPTC）或其他的营养添加物。

配制用于制备 LB 平板的 LB 琼脂，每升加 5g 琼脂或琼脂糖。

LB 培养基（单元 13.5）

溶解 10g NaCl、10g 细菌-胰蛋白胨（Difco）和 5g 酵母提取物（Difco）于 1L 水中，高压灭菌，4℃保存。

亮抑蛋白酶肽，2mg/ml（单元 7.3）

20mg 亮抑蛋白酶肽

10ml 水

以合适的体积分装

－20℃保存（至少稳定 1 年）

肝匀浆基液（LHM）（单元 3.5）

在 250ml 水中加入：

18.2g 甘露醇（终浓度 0.2mol/L）

8.55g 蔗糖（终浓度 50mmol/L）

0.37g KCl（终浓度 10mmol/L）

√5.0ml 100mmol/L Na_2EDTA（终浓度 1mmol/L）

√50ml 100mmol/L HEPES（终浓度 10mmol/L）

用 KOH 调节 pH 至 7.4

加水至 500ml

4℃可保存 1～2 天

上样缓冲液，2×（单元 10.4）

√0.3ml 1mol/L Tris · Cl，pH6.8（终浓度 15mmol/L）

√2.0ml 10% SDS（终浓度 1% w/v）

√0.05ml 100mmol/L EDTA，pH7.0（终浓度 25mmol/L）

0.2g DTT（终浓度 65mmol/L）

0.5ml 1% 溴酚蓝（终浓度 0.025% w/v）

1.2ml 100%甘油或蔗糖（终浓度 6% w/v）

5.75ml 水

总体积 10ml

4℃可保存 6 个月

长期标记培养基（90% v/v 不含甲硫氨酸培养基）（单元 8.1）

将 9 体积缺乏甲硫氨酸或其他适当的氨基酸的脉冲标记培养基（见配方）和 1 体积含有相同氨基酸的追踪培养基（见配方）混合。4℃可储存 2 周。

Lovastatin，有活性的，10mmol/L（单元 11.2）

52mg Iovastatin（Merck、Sharp 和 Dohme Research Pharmaceuticals）溶于 1.04ml 95%的乙醇中。加入 813μl 的 1mol/L NaOH，用 1mol/L HCl 调整 pH 至 7.2，并用过滤除菌的去离子水或培养基稀释到 13ml（4mg/ml；终浓度 10mmol/L）。-20℃储存不超过一个月。

低离子浓度悬浮基液（LISM）（单元 3.8）

在 200ml 水中，加入 20μl 1mol/L $MgCl_2$（见配方，终浓度 0.1mmol/L）。4℃可保存 2 周。

Iowry 试剂 A（附录 3B）

21.2g 碳酸钠（2% w/v）

40ml 1mol/L NaOH（或 4.0g NaOH；终浓度 0.1mol/L）

加入蒸馏水或去离子水至 1L

当日新鲜配制

Iowry 试剂 B（附录 3B）

0.5g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$（终浓度 0.5% w/v）

1g 酒石酸钠（终浓度 1% w/v）

当日新鲜配制

用酒石酸二钠、酒石酸钾或柠檬酸钠代替酒石酸钠，可能有更好的溶解性。

Lowry 试剂 C（1mol/L Folin 酚试剂）（附录 3B）

用相同体积的水稀释 2mol/L 的 Folin 酚（Sigma、Fisher 或 VWR），用前即配。

Lowry 试剂 D（试剂 A 和 B 混合）（附录 3B）

将 1 体积 Lowry 试剂 B 和 50 体积 Lowry 试剂 A（见配方）混合，用前即配。

Lowry 试剂 D（附录 3B）

每 100ml Lowry 试剂 D（见配方）中加入 2ml 10%（w/v）用去离子水溶解的十二烷基硫酸钠（SDS；20%溶液见配方）。用前即配。

LPC，10mg/ml（单元 12.7）

在 DMSO 中加入亮抑蛋白酶肽、抑胃肽酶、胰凝乳蛋白酶抑制剂，每种均为 10mg/ml，分装储存于-20℃。

LTE 溶液（单元 13.3）

√10μl 0.1%（w/v）胰蛋白酶溶液（终浓度 0.0001%）

√100μl 100mmol/L EDTA 或乙二醇双（β-氨基乙醚）四乙酸（EGTA）（终浓度 1mmol/L）

√9.89ml HCMF

新鲜配制

EDTA 或 EGTA 具有同样的效果。

Luminol（氨基苯二酰肼）显影溶液（单元 7.7）

0.5ml 10×Luminol 储存液［40 mg Luminol（Sigma）溶于 10ml DMSO 中］

0.5ml 10×p-碘苯酚储存液［可选用；10mg p-碘苯酚（Aldrich）溶于 10ml DMSO 中］

√2.5ml 100mmol/L Tris·Cl，pH7.5

25μl 3% H_2O_2

加水至 5ml

临用前配制

预混合的 Luminol 底物混合物（Mast Immunosystems；Amersham ECL；Du Pont NEN Renaissance；Kirkegaard & Perry LumiGLO）可能会用得上。p-碘苯酚是一种可选用的增强剂，能增加光的输出。Luminol 和 p-碘苯酚储存液在−20℃最多保存 6 个月。

淋巴细胞培养基（LCM）（单元 2.2）

Iscove 改良的 Dulbecco 培养基（IMDM；Life Technologies）中含有：

100U/ml 青霉素

100μg/ml 链霉素

10%（v/v）肝素化人血浆

4℃可保存 2 周

裂解缓冲液（单元 7.3）

2.59g 尿素（超纯）

1.6ml 水

0.25ml 2-巯基乙醇

0.3ml 两性电解质

√1.0ml 20%（w/v）Triton X-100 溶液

用前即配

使用与配制 IEF 凝胶相同的两性电解质。

必要时用 30℃水浴加热混合物使尿素溶解。

裂解缓冲液（单元 11.3）

√30ml 5mol/L NaCl（终浓度 0.15mol/L）

12ml 0.5mol/L Na_2HPO_4

8ml NaH_2PO_4

√10ml 0.5mol/L EDTA（终浓度 5.0mmol/L）

10ml 乙基苯基聚乙二醇 P-40（终浓度 1.0% v/v）

10g 去氧胆酸钠（终浓度 1.0% w/v）

1g SDS（终浓度 0.1% w/v）

2.1g NaF（终浓度 50.0mmol/L）

1.8g $NaVO_4$（终浓度 1.0mmol/L）

10ml 抑蛋白酶肽（终浓度 1.0% v/v）

928ml 双蒸水

0.45μm 的滤膜过滤

4℃可保存 1 个月

裂解缓冲液（单元 11.4）

√5mmol/L Tris·Cl，pH8.0

√20mmol/L EDTA

√0.5%（v/v）Triton X-100

裂解缓冲液（单元 11.5）

在 450ml 水中加入：

2.98g HEPES（终浓度 25mmol/L）

0.238g $MgCl_2$（终浓度 5mmol/L）

√1ml 0.5mol/L EGTA，pH7.0

在 4℃用 10mol/L NaOH 调节 pH 至 7.5

加水至 500ml

4℃保存无限期

临用前每 1ml 缓冲液中加入：

√ 10μl 100mmol/L PMSF

1μl 10μg/ml 抑胃肽酶 A 乙醇溶液（储存液可在－20℃长期保存）

1μl 10μg/ml 亮抑蛋白酶肽乙醇溶液（储存液可在－20℃长期保存）

裂解缓冲液（单元 13.11）

3.03g Tris 碱（终浓度 25mmol/L）

1.25g *N*-乙基马来酰胺（NEM；终浓度 10mmol/L）

0.783g 苯甲脒·Cl（终浓度 5mmol/L）

13.12g ε-氨基己酸（终浓度 0.1mol/L）

7.44g EDTA（终浓度 20mmol/L）

加水至 900ml

加热溶解

用 1mol/L HCl 调节 pH 至 7.5

√ 加 1ml 0.2mol/L 溶于乙醇的苯甲磺酰氟（PMSF），同时迅速旋涡混匀防止沉淀（终浓度 0.2mmol/L）

√加 2ml Triton X-100（终浓度 0.2% v/v）

缓慢搅动溶解 Triton
加水至 1L
用前新鲜配制

细胞膜穴样内陷裂解缓冲液（单元 6.1）

√1%（w/v）Triton X-100
25mmol/L 2-(N-吗啉）乙磺酸（MES）
√150mmol/L NaCl
4℃可保存 1 个月
临用前，每 10ml 缓冲液加入 100μl 饱和冰冷的 PMSF（见配方）乙醇溶液。

裂解混合液（单元 10.3）

√50mmol/L Tris·Cl，pH7.5
√150mmol/L NaCl
√5mmol/L $MgCl_2$
0.5%（w/v）去污剂
储存于 4℃

去污剂的选择取决于具体实验。对于稳定的蛋白复合物，常规使用 0.5% Igepal CA-630（Sigma）或 Triton X-100。对于不稳定的蛋白复合物，应使用 0.5%毛地黄皂苷或 3-[(3-胆酰胺丙基)-二甲胺]-1-丙烷磺酸（CHAPS)。

甘露醇缓冲液 A（单元 3.6）

在 100ml 水中加入：
9.13g 甘露醇（终浓度 0.25mol/L）
38mg EGTA（终浓度 0.5mmol/L）
0.2g 牛血清白蛋白（BSA；终浓度 0.1% w/v）
√10ml 100mmol/L HEPES（终浓度 5mmol/L）
调节 pH 至 7.4
加水至 200ml
4℃保存 1～2 天

甘露醇缓冲液 B

在 100ml 水中加入：
16.4g 甘露醇（终浓度 0.45mol/L）
152mg EGTA（终浓度 2.0mmol/L）
0.4g BSA（终浓度 0.2% w/v）
√ 100ml 100mmol/L PEPES（终浓度 50mmol/L）
调节 pH 至 7.4
加水至 200ml
4℃可保存 1～2 天

基质培养基（单元 13.10）

在汇合培养基（见处方）中，加入 L-抗坏血酸钠盐（Sigma）以达到 50μg/ml 的终

浓度，可以用 50mg/ml 的储存液新鲜配制。用 0.2μm 的滤器过滤消毒。

MEM

见表 A.1.2

MES，100mmol/L（单元 3.7）

4.16g 2-(N-吗啉）乙磺酸（MES）

加水至 200ml

－20℃可保存 2～3 个月

MES 缓冲液（单元 3.9）

√5mmol/L 2-（N-吗啉）乙磺酸（MES），pH5.5

√1mmol/L EDTA

√1mmol/L KCl

4℃可保存 1 个月

甲硫氨酸缺失标记培养基（单元 12.3）

甲硫氨酸缺失标记培养基（Sigma）

1×亮氨酸（200×溶液，79mmol/L；组织培养等级；Sigma）

1×赖氨酸（200×溶液，80mmol/L；组织培养等级；Sigma）

√20mmol/L HEPES 酸，pH7.2，

4℃可保存 1 年

甲硫氨酸缺失标记培养基是用添加 Earle 盐的低限量基本培养基（MEM）和 L-谷氨酰胺配制而成（但不加 L-亮氨酸、L-赖氨酸、L-甲硫氨酸或碳酸氢钠）。

$MgCl_2$，1mol/L

20.3g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$

加水至 100ml

无 $MgCl_2$ PCR 扩增缓冲剂，10×（附录 3E）

√500mmol/L KCl

√100mmol/L Tris·Cl，pH9.0（于 25℃）

√0.1%（v/v）Triton X-100

－20℃保存无限期

这种缓冲液能够从 Promega 获得，它添加了 Taq DNA 聚合酶。

$MgSO_4$，1mol/L

24.6g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

加水至 100ml

MIB 缓冲剂（单元 12.8）

配制 MIB 缓冲液浓缩液：

50mmol/L 蔗糖

√10mmol/L KCl

10mmol/L 琥珀酸钠

√10mmol/L HEPES，用 KOH 调节至 pH7.5

√5mmol/L EGTA

210mmol/L 甘露醇

√0.5mmol/L 二硫苏糖醇，每次用前新鲜加入

4℃保存无期限

配制 MIB 缓冲液：用水稀释 2.45ml MIB 缓冲液浓缩液至 10ml

如果发现有微生物生长则丢弃 MIB 缓冲液浓缩液

迁移培养基（单元 14.1）

制备碳酸氢盐缓冲的底层琼脂糖平板：用碳酸氢钠缓冲的 1×RPMI 1640 加 10%（v/v）热灭活 BCS。

制备 HEPES 缓冲的底层琼脂糖平板：使用不含碳酸氢钠的 1×RPMI 1640（用低内毒素 10×RPMI 1640 储存液配制，Sigma），其中添加 10mmol/L HEPES 和 10%（v/v）热灭活 BCS。过滤消毒，4℃可保存 6 个月。

对于任一培养基，10% BCS 均可由 0.5%（w/v）BSA 代替。

温和裂解缓冲液（单元 9.1）

10mmol/L 3-[(3-胆酰胺丙基)-二甲胺] -1-丙烷磺酸（CHAPS）或 1%（w/w）乙基苯基聚乙二醇 P-40（NP-40）

√0.15mol/L NaCl

√0.01mol/L 磷酸钠，pH7.2

√2mmol/L EDTA

50mmol/L 氟化钠

0.2mmol/L 钒酸钠，新鲜加入 0.2mol/L 储存溶液而配制

100U/ml 抑蛋白酶肽（Trasylol，Pentex/Miles）

不加钒酸盐的缓冲液在 4℃可保存 1 年。

CHAPS 是比 NP-40 更温和的去污剂，但产生沉淀具有较高的本底，并且可能溶解某些蛋白质使其减效。

钒酸钠储存溶液可存放于塑料容器中，室温保存。

含羞草素，100mmol/L（单元 11.2）

100mmol/L L-含羞草素（Sigma）以 PBS（见配方）配制，pH7.4，4℃保存小于 2 个月。

线粒体悬浮基液 I（单元 3.5）

在 50ml 水中加入：

8.5g 蔗糖（终浓度 0.25mol/L）

1.0ml 1mol/L Tris 碱（终浓度 10mmol/L）

用乙酸调节 pH 至 7.0

加水至 100ml

4℃可保存 1～2 天

线粒体悬浮基液 II（单元 3.5）

在 100ml 水中加入：

21.9g 甘露醇（终浓度 0.6mol/L）

√40ml 100mmol/L HEPES（终浓度 20mmol/L）

用 KOH 调节 pH 至 7.4

加水至 200ml

4℃可保存 1～2 天

有丝分裂缓冲液（单元 12.6）

24ml 1mol/L β-磷酸甘油，pH7.3

√12ml 0.5mol/L EGTA，pH8.0

√4.5ml 1mol/L $MgCl_2$

√100μl 1mol/L DTT

加水至 100ml

用 NaOH 调节 pH 至 7.3

4℃保存，如果没有沉淀可以一直保存。

混合微团洗涤缓冲液（单元 10.4）

√37.5ml 4mol/L NaCl（终浓度 150mmol/L）

20ml 1mol/L TEA·Cl，pH8.6（终浓度 20mmol/L）

√10ml 0.5mol/L EDTA，pH8.0（终浓度 5mmol/L）

1.0ml Trasylol（终浓度 0.001% v/v）

√2.0ml 10% NaN_3（终浓度 0.02% w/v）

60ml 65%（w/w）、85%（w/v）或 39g 蔗糖

942ml 水

√50ml 20% Triton X-100（终浓度 1% v/v）

√20ml 10% SDS（终浓度 0.2% v/v）

总体积为 1L

4℃可保存 6 个月

常规 SEC 的流动相（单元 6.3）

0.1mol/L 磷酸钠缓冲液，pH 为 7.0（见配方），含 0.1mol/L NaCl，用 0.22μm 的滤膜过滤。滤后的缓冲液 4℃可保存 1 周。

如果其中加入了抗菌剂，如叠氮化物，则可在 4℃保存几个月。

高离子强度的缓冲液用于阻止离子交换反应，尤其适用于硅柱。基于这个目的，经常将 0.1～0.2mol/L 的氯化钠加入 SEC 缓冲液中。对于每个单独包装的材料，最好查阅厂商的技术文献以寻找相关使用建议。

假如加了抗菌剂，一定要保证其与检测系统协调。例如，0.02%（w/v）的叠氮钠溶液在低紫外波长处有很高的吸收峰，这将导致 214nm 处无法检测。

SE-HPLC 的流动相（单元 6.3）

0.2mol/L 磷酸钠缓冲液，pH7.0（见处方）。用 0.22μm 的滤膜过滤。滤后的缓冲液 4℃可保存 1 周。

如果其中加入了抗菌剂，如叠氮化物，则可在 4℃保存几个月。

高离子强度的缓冲液用于阻止离子交换反应，尤其适用于硅柱。基于这个目的，经常将0.1～0.2mol/L的氯化钠加入SEC缓冲液中。然而，如果使用了不锈钢系统，就应尽量避免使用氯化物以防腐蚀。对于每一种柱子，最好查阅厂商的技术文献以寻找相关使用建议。

假如加了抗菌剂，一定要保证其与检测系统协调。例如，0.02%（w/v）的叠氮钠溶液在低紫外波长处有很高的吸收峰，这将导致214nm处无法检测。

改良Barth（MB）溶液（单元12.5）

准备下列储液：

储液A：

64g NaCl

1g KCl

2.5g $NaHCO_3$

44.5g HEPES

用NaOH调节pH至7.6，加水至500ml，20ml分装，－20℃保存。

储液B：

0.95g $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$

0.75g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$

1.23g 无水 $MgSO_4$

加水至500ml

20ml分装，－20℃保存。

无钙的储液B：

1.23g 无水 $MgSO_4$ 溶于500ml水，20ml分装，－20℃保存。

加钙的改良Barth溶液：

460ml水

20ml储液A（见上）

20ml储液B（见上）

2.5ml 10mg/ml庆大霉素溶液（Sigma）

4℃可保存数月

无钙的改良Barth溶液：

460ml水

20ml储液A（见上）

20ml无钙储液B（见上）

2.5ml 10mg/ml庆大霉素溶液（Sigma）

4℃可保存数月

改良的Ringer溶液（MMR），pH7.7，10×（单元12.5和12.6）

√1mol/L NaCl

√20mmol/L KCl

√10mmol/L $MgSO_4$

√25 mmol/L $CaCl_2$

√5mmol/L HEPES，pH7.8

√0.8mmol/L EDTA

室温储存不限期

使用前将 10×MMR 用水稀释成 0.25×MMR（1∶40）

做间期提取实验大约需要 200ml 0.25×MMR。

改良的转录缓冲液（MTB），5×（10ml）（单元 12.1）

成分	5×储存液的浓度
√2ml 1mol/L Tris·Cl，pH8.1	200mmol/L
√300μl 1mol/L $MgCl_2$	30mmol/L
√500μl 1mol/L NaCl	50mmol/L
200μl 250mmol/L 精脒	5mmol/L
√250μl 10mg/ml BSA	250μg/ml
√200μl 2.5% Triton X-100	0.05%
√6.55ml DEPCW	

按此配方以 DEPCW 配制所有试剂的储存液，高温高压或过滤消毒。将 5×MTB 分装为 1ml，－20℃可保存 1 年。

蜜糖/琼脂板（单元 12.9）

100ml 水

14.6ml 蜜糖

3.6g 精细琼脂

高压消毒，倒入泡沫聚苯乙烯肉盘中，静置。临用前在表面撒一厚层酵母糊（将 Red Star 酵母和水混合均匀而制得，使其易铺展但又不会太稀到粘住昆虫，达到罐装番茄酱的程度就刚刚好）。4℃可保存 1 周。

MOPS，100mmol/L（单元 3.7）

4.18g 3-(N-吗啉）丙磺酸（MOPS）

加水至 200ml

－20℃储存 2～3 个月

封固介质（单元 12.7）

9ml 甘油（终浓度 90% v/v）

√1ml 0.2mol/L Tris·Cl，pH8.0（终浓度 10% v/v 或 0.02mol/L）

室温可储存 1 年

封固介质（单元 13.5）

√10ml 1mol/L Tris·Cl，pH9.0

70ml 甘油（终浓度 70% v/v）

5.09g n-丙基-没食子酸盐（终浓度 0.24mol/L）

加水至 100ml

调 pH 至 9.0

1ml 分装，－20℃储存

肌肉匀浆基液Ⅰ（单元 3.5）

在 100 至＜200ml 水中加入：

6.84g 蔗糖（终浓度 0.1mol/L）

0.686g KCl（终浓度 46mmol/L）

√20ml 100mmol/L Na_2EDTA（终浓度 10mmol/L）

√2.0ml 1mol/L Tris・Cl（终浓度 10mmol/L）

调 pH 至 7.4

加水至 200ml

4℃可储存 1～2 天

用前即配：加 1.0g 牛血清蛋白（BSA；终浓度 0.5% w/v）和 40mg 枯草菌蛋白酶（终浓度 0.2mg/ml）

Sigma 现在有枯草菌蛋白酶产品出售，归属蛋白酶Ⅷ型。

肌肉匀浆基液Ⅱ（单元 3.5）

在 100ml 水中加入：

6.84g 蔗糖（终浓度 0.1mol/L）

0.686g KCl（终浓度 46mmol/L）

√20ml 100mmol/L Na_2EDTA（终浓度 10mmol/L）

√2.0ml 1mol/L Tris・Cl（终浓度 10mmol/L）

调 pH 至 7.4

加水至 200ml

4℃可储存 1～2 天

肌肉清洗缓冲剂（单元 3.5）

在 100ml 水中加入：

7.64g 甘露醇（终浓度 0.2mol/L）

4.78g 蔗糖（终浓度 70mmol/L）

√0.2ml 100mmol/L Na_2EDTA（终浓度 0.1mmol/L）

√2.0ml 1mol/L Tris・Cl（终浓度 10mmol/L）

调 pH 至 7.4

加水至 200ml

4℃可储存 1～2 天

支原体琼脂板（单元 1.5）

23.8g 支原体琼脂基质（BBL）

600ml 去离子水或蒸馏水

搅拌下加热至沸腾以溶解所有成分。121℃高压消毒 15min（单元 1.4）。冷却至 50℃，无菌条件下加入下列已灭菌溶液，这些溶液都已平衡至 37℃。

200ml 马血清（Life Technologies）

100ml 新鲜酵母提取溶液（Life Technologies）

100ml 葡萄糖/精氨酸补充液

无菌条件下将 pH 调至 7.2～7.4，每 10ml 一份倒入无菌的 60mm×15mm 培养皿中。4～8℃可保存 6 周。

在加入琼脂液之前，溶液应先预热至 37℃以避免立即凝胶化。用于制备支原体肉汤和琼脂培养基的无菌新鲜酵母提取液通常包含大量沉淀物，在用于配制培养基前必须去除。可以粗过滤后再以 0.2μm 的膜过滤消毒（单元 1.4）。

由于会干扰实验，应避免使琼脂板中产生气泡。配制培养基时，添加及混合热不稳定添加剂，都要小心操作避免产生气泡。大部分泡沫都位于培养基表面，所以可以在分装时用半自动分装仪避开泡沫，例如，使用入液管处带有坠子的蠕动泵，以保证培养基从培养瓶表面以下吸出。如果在培养基分装至培养皿时有少量气泡形成，可以在琼脂凝固前将煤气灯的火焰轻轻掠过琼脂表面以消除气泡。

支原体肉汤培养基（单元 1.5）

14.7g 支原体肉汤基质（BBL）

20mg 酚红

600ml 去离子水或蒸馏水

混合均匀溶解所有成分。121℃高压消毒 15min（单元 1.4）。冷却至室温，无菌条件下加入下列灭菌溶液：

200ml 马血清（Life Technologies）

100ml 新鲜酵母提取溶液（Life Technologies）

√100ml 葡萄糖/精氨酸补充液

无菌条件下将 pH 调至 7.2～7.4，然后按 6ml 一份，分装于 16mm×125mm 试管中。4～8℃可保存 12 周。

用于制备支原体肉汤和琼脂培养基的无菌新鲜酵母提取液通常包含大量沉淀物，在用于配制培养基前必须去除。可以粗过滤后再以 0.2μm 的膜过滤消毒（单元 1.4）。

NaCl，5mol/L

292g NaCl

加水至 1L

2mol/L NaCl 磷酸盐/盐溶液/EDTA（单元 13.7）

29.4g NaCl

√5ml 0.5mol/L 磷酸钠，pH7.7

√6.3ml 0.2mol/L EDTA，pH7.0

√0.25ml 20%（w/v）叠氮钠

加水至 1000ml

室温储存数周

NaH_2PO_4，0.5mol/L，pH7.6（单元 8.4）

在 100ml 水中加入 6.9g NaH_2PO_4，用 0.5mol/L Na_2HPO_4 调整 pH 至 7.6，4℃无限期储存。

NaOH，10mol/L

在 450ml 水中溶解 400g NaOH

加水至1L

Na_3VO_4 100mmol/L

将1.84g Na_3VO_4（Sigma）加入约75ml水中（pH约14.0）。然后加入浓盐酸至pH为10.0。溶液此时会变黄。煮沸3min，pH会变为9.0左右，溶液几乎变白。再加入2.5ml 1mol/L NaOH并煮沸3min，加水定容至100ml。分装成1ml，−20℃可无限期保存。

中性pH缓冲液（单元10.2）

8.8g NaCl（终浓度150mmol/L）
0.37g KCl（终浓度5mmol/L）
0.11g $CaCl_2$（终浓度1mmol/L）
0.20g $MgCl_2$（终浓度1mmol/L）
4.77g HEPES酸（终浓度20mmol/L）
蒸馏水调整至1L
调整pH至7.4
4℃储存6个月

中性化缓冲液（0.2mol/L NaP_i）（单元13.12）

配制下列储存溶液：
溶液A：2.78g NaH_2PO_4溶于100ml水
溶液B：5.365g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$溶于100ml水
配制工作液：
15.2ml溶液A
64.8ml溶液B
√16.6ml 5mol/L NaCl
加入80ml 0.1mol/L NaOH
4℃储存1年

NIH 3T3细胞，储备培养（单元13.10）

尽管在实验方案的步骤中推荐使用FBS的培养基，NIH-3T3细胞（ATCC #CRL-1658）却必须依惯例培养于添加了10%小牛血清的DMEM中（见含小牛血清培养基的配方）。在维持储备培养阶段，绝对不可让培养的NIH-3T3细胞长满。当细胞达到80%汇合时（约每周一次），就应以1∶20的比例稀释再培养。

p-硝基苯磷酸酯酶反应缓冲液，含或不含K^+（单元3.2）

√5ml 100mmol/L KCl（终浓度10mmol/L）
√1.5ml 100mmol/L $MgCl_2$（终浓度3mmol/L）
√25ml 100mmol/L Tris·Cl，pH7.4（终浓度50mmol/L）
45mg茶碱（终浓度5mmol/L）
加水至50ml
调节pH至7.4
在室温下现配现用

不含 K^+ 的缓冲液：使用 5ml 100mmol/L 的 NaCl（终浓度 10mmol/L）代替 KCl。

这个体积足以对所有梯度组分和空白底物进行两种孵育时间的双管分析（够 60 个测试管）。

Nocodazole，4mg/ml（单元 11.2）

用 DMSO 配制 4mg/ml Nocodazole（Aldrich）

－20℃储存小于 6 个月，4℃储存小于 1 个月

非变性裂解缓冲液（单元 8.5）

√1%（w/v）Triton X-100

√50mmol/L Tirs·Cl，pH7.4

√300mmol/L NaCl

√5mmol/L EDTA

√0.02%（w/v）叠氮钠

4℃保存 6 个月

临用前加入

10mmol/L 碘乙酰胺（粉末）

√1mmol/L PMSF

2μg/ml 亮抑蛋白酶肽（用水配制的 10mg/ml 储存液在－20℃可保存 6 个月）

1mmol/L 4-(2-氨基乙醇)苯磺酰氟（AEBSF），新鲜加入溶于水的 0.1mol/L 储存溶液，可以用来代替 PMSF。AEBSF 储存液可于－20℃保存 1 年。

4dNTP 混合物（附录 3E）

2mmol/L 4dNTP 混合物：用 TE 缓冲液配制每种 dNTP，2mmol/L，pH7.5（见配方）。1ml 分装，－20℃储存 1 年。

25mmol/L 4dNTP 混合物：等体积混合 100mmol/L dNTP（Promega），1ml 分装，－20℃无限期储存。

4NTP 混合液，12.5mmol/L（单元 2.1）

50mmol/L 单核苷酸储存液（ATP、CTP、GTP 及 UTP）：将每种核苷酸 500mg 放入单独的已消毒的 50ml 试管中。加入 DEPCW 至合适体积。各取 1μl 置于 pH 试纸上测试 pH，逐滴加入 1mol/L NaCl 调整 pH 至 7.5。过滤消毒，1ml 分装，－20℃可保存 1 年。

10mmol/L 单核苷酸储存液：用 DEPCW 1/5 稀释。500μl 分装，－20℃可保存 1 年。

12.5mmol/L 4NTP 混合液：将 50mmol/L ATP、CTP、GTP 及 UTP 各取 2.5ml 混合（共 10ml）。500μl 分装，－20℃可保存 1 年。

核分离基液（NIM）（单元 3.8）

在 100ml 水中加入：

17.1g 蔗糖（终浓度 0.25mol/L）

0.37g KCl（终浓度 25mmol/L）

√1ml 1mol/L $MgCl_2$（终浓度 5mmol/L）

√2ml 1mol/L Tris・HCl（终浓度 10mmol/L）

如果需要，调整 pH 至 7.4

加水至 200ml

4℃储存 2～3 天

核膜储存基液（NMSM）（单元 3.8）

在 100ml 水中加入：

40ml 甘油（终浓度 20% v/v）

√2ml 100mmol/L Na_2EDTA（终浓度 1mmol/L）

√2ml 1mol/L Tris・HCl（终浓度 10mmol/L）

如果需要，调整 pH7.5

加水至 200ml

4℃储存 2～3 天

核酸酶 S7，15 000U/ml（单元 12.1）

在冻干的金黄色葡萄球菌核酸酶 S7 中加入 1ml 水，使其浓度达到 15 000U/ml。每次使用前新鲜配制，弃去残留溶液。

使用时 1/100 稀释。

核悬浮基液（NSM）（单元 3.8）

在 100ml 水中加入：

17.1g 蔗糖（终浓度 0.25mol/L）

√1ml 1mol/L $MgCl_2$（终浓度 5mmol/L）

√10ml 1mol/L Tris・HCl（终浓度 50mmol/L）

如果需要，调整 pH 至 7.4

加水至 200ml

4℃储存 2～3 天

临用前加入 1ml 200mmol/L PMSF（见配方）

5′-核苷酸酶反应缓冲液（单元 3.2）

√27.0ml 100mmol/L Tris・HCl，pH8.0（终浓度 90mmol/L）

√3.0ml 100mmol/L $MgCl_2$（终浓度 10mmol/L）

15mg 腺苷-5′-单磷酸

新鲜配制，室温下使用

这个体积足以对所有梯度组分和空白底物进行两种孵育时间的双管分析（够 66 个测试管）。

用于平衡梯度的 Nycodenz 溶液（单元 3.9）

以合适体积的 HEPES/KAc 裂解缓冲液（见配方）稀释 50%的 Nycodenz/山梨醇储存液（见配方）来配制以下溶液：37%、31%、27%、23%、20%、17%、13%及 9%（w/v）Nycodenz 溶液。临用前，将每种溶液所需体积分装至独立的 15ml 试管中，加入 500×蛋白酶抑制混合剂 A 和 B（PIC-A 及 PIC-B，见配方）达到终浓度 1×。加入 1mmol/L PMSF 和 5μg/ml α-巨球蛋白（终浓度；蛋白酶抑制剂混合储存液 A，见配

方）。如有需要，加入 DTT 至 1mmol/L，但要去掉 α-巨球蛋白。

另外，每种溶液均可以类似 60%蔗糖储存溶液的方法配制。

Nycodenz/山梨醇储存溶液，50%（w/v）（单元 3.9）

50%（w/v）Nycodenz 粉末

√50mmol/L HEPES/KOH，pH6.8

√1mmol/L EDTA

200mmol/L 山梨醇

分装，可在－20℃保存数周

务必提前准备好，因为 Nycodenz 粉末要花几个小时才能溶解。为了最大限度避免颗粒的形成，加 Nycodenz 粉末时，要边加边搅拌。

Nycodenz 分级梯度溶液（单元 3.9）

18%（w/v）Nycodenz 分级梯度溶液：将 10ml 2×的缓冲液 B（见配方）与 7.2ml 50% Nycodenz 储存溶液（见配方）混合，用水调整体积至 20ml。新鲜配制，临用前加入 PMSF 使浓度达到 1mmol/L。

14.5%（w/v）Nycodenz 分级梯度溶液：将 10ml 2×的缓冲液 B（见配方）与 5.8ml 50% Nycodenz 储存溶液（见配方）混合，用水调整体积至 20ml。新鲜配制，临用前加入 PMSF 使浓度达到 1mmol/L。

Nycodenz 储存溶液，50%（w/v）（基本方案 6）（单元 3.9）

用消毒过的水溶解 50%（w/v）Nycodenz（Life Technologies），慢慢加入粉末同时搅拌。可在－20℃保存数月。

Nycodenz 粉末可能要花几个小时才能完全溶解。

用于核的 OptiPrep 稀释液（ODN）（单元 3.8）

在 100ml 水中加入：

17.1g 蔗糖（终浓度 0.25mol/L）

2.22g KCl（终浓度 150mmol/L）

√6ml 1mol/L $MgCl_2$（终浓度 30mmol/L）

√12ml 1mol/L Tris・Cl（终浓度 60mmol/L）

如果需要，调整 pH 至 7.4

加水至 200ml

4℃储存 2～3 天

苔黑酚试剂（单元 3.8）

在 50ml 浓 HCl 中加入 0.5g 苔黑酚（终浓度 1% w/v）和 0.25g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$（终浓度 0.5% w/v）。

新鲜配制，使用前冰上保存。

正磷酸（H_3PO_4），0.1mol/L（单元 7.3）

13.7ml 85%正磷酸

加水至 2L

当日新鲜配制

使用前必须除气。

Oxalyticase 缓冲液（单元 3.9）

7.5ml 1mol/L 磷酸钾缓冲液，pH7.5（见配方）

22.5ml 4mol/L 山梨醇

120ml 0.2×YDP 培养基（单元 1.6）

4℃可储存数周

终浓度为 50mmol/L 磷酸钾，pH7.5，0.6mol/L 山梨醇和 0.16×YPD。每种梯度液大概需要 15ml。

木瓜蛋白酶消化缓冲液（单元 13.11）

11.69g NaCl（终浓度 2mol/L）

0.744g EDTA（终浓度 10mmol/L）

0.4102g 乙酸钠（终浓度 50mmol/L）

0.0175g 半胱氨酸·Cl（终浓度 0.01mol/L）

加水至 90ml

用 1mol/L 乙酸调整 pH 至 5.5

加水至 100ml

使用前新鲜配制

多聚甲醛，4%（w/v）（单元 11.4）

将 8g 多聚甲醛粉末（如 Sigma）加入 100ml 水中，在通风橱中加热至 60℃。如有必要，逐滴加入 NaOH（每次 1～2 滴）帮助溶解。当固体全部溶解后，将溶液冷却至室温，然后加入 100ml 2×PBS（见配方）。4℃保存，每周配制少量。

多聚甲醛溶液（单元 12.4）

储存溶液（6%）：在通风橱中将 150ml 水加热到 60℃。离开热源加入 9g 多聚甲醛。边搅拌边用巴斯德吸量管加两滴 5mol/L NaOH。继续搅拌直至溶解。4℃可保存 1 个月。

工作溶液（3%）：使用当天用 10×转移缓冲液（TB；见配方）和水将储存液稀释至 3%。

PBS，亦见磷酸缓冲盐溶液

PBS（磷酸缓冲盐溶液）

8.00g NaCl（0.137mol/L）

0.20g KCl（2.7mmol/L）

0.24g KH_2PO_4（1.4mmol/L）

1.44g Na_2HPO_4（0.01mol/L）

加水至 1L

PBS（单元 13.5）

8.00g NaCl（终浓度 137mmol/L）

0.20g KCl（终浓度 2.7mmol/L）

2.16g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$（终浓度 8mmol/L）

0.20g KH_2PO_4（终浓度 1.5mmol/L）

990ml 水

用 1mol/L HCl 或 1mol/L NaOH 调整 pH 至 7.4

用水调整体积至 1L

0.22μm 滤器过滤消毒

4℃储存

PBS 10×(单元 7.3)

152g NaCl

24g 无水 NaH_2PO_4

1600ml 水

用 NaOH 调整 pH 约 6.7

加水至 2L

室温保存（至少稳定 1 个月）

1×溶液 pH 应当为 7.3～7.5。终浓度为 130mmol/L NaCl 和 10mmol/L 磷酸钠。

PBS/EDTA，4×(单元 12.4)

46ml 0.2mol/L 磷酸钠，单碱（NaH_2PO_4）

154ml 0.2mol/L 磷酸钠，双碱（Na_2HPO_4）

35.1g NaCl

加水调至 900ml

√加入 8ml 0.5mol/L EDTA

用 NaOH 调整 pH 至 7.4

用水调至 1L

4℃储存

PBS/蛋白酶抑制剂（单元 9.3）

新鲜配制的 PBS（见配方）中含有：

10μg/ml 亮抑蛋白酶肽（10mg/ml 水配的储存液；－20℃储存少于 1 年）

10μg/ml 抑蛋白酶肽（2mg/ml 水配的储存液；－20℃储存少于 1 年）

2μg/ml 抑胃肽酶 A（10mg/ml 乙醇或甲醇配的储存液，－20℃储存少于 1 年）

1mmol/L 苯甲磺酰氟（PMSF）

新鲜配制

PBS-T（单元 11.5）

在 900ml 水中加入：

11.5g Na_2HPO_4

2.96g NaH_2PO_4

5.84g NaCl

加水至 1L

检测 pH（应当为 7.5）

加 2.5ml 20%（w/v）Tween 20（如 Bio-Rad)

含 Ca^{2+}/Mg^{2+} PBS（单元 13.5）

8.00g NaCl（137mmol/L）

0.20g KCl（2.7mmol/L）

2.16g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$（8mmol/L）

0.20g KH_2PO_4（1.5mmol/L）

0.10g $CaCl_2$（0.9mmol/L）

0.10g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$（0.5mmol/L）

990ml 水

用 1mol/L HCl 或 1mol/L NaOH 调整 pH 至 7.4

用水调整体积至 1L

0.22μm 滤器过滤消毒

4℃储存

含蛋白水解抑制剂的 PBS（PBS/I 缓冲液）（单元 7.3）

√20ml 10×PBS

√20ml 2%（w/v）EDTA，pH 为 7.0

√200μl 0.15mol/L 溶于二丙醛的苯甲磺酰氟（PMSF）

√100μl 2mg/ml 亮抑蛋白酶肽

√200μl 1mg/ml 抑胃肽酶

以 HCl 调整 pH 至 7.2

加水至 200ml

临用前现配

在低温（0～4℃）条件下，异丙基氟磷酸（DFP）是比 PMSF 更好的丝氨酸蛋白酶抑制剂；然而，尽管两种化合物都有毒性，由于 DFP 具有挥发性，使用时必须格外小心。如若使用 DFP，需在化学通风橱内操作，并小心遵守注意事项。DFP 和 PMSF 在中性水溶液中的半衰期只有几个小时，并且当 pH 升高超过中性时降解迅速加快。要在临用前现配水溶液。通常用 1mol/L NaOH 除去剩余 DFP 和 PMSF 的活性。

终浓度为：10mmol/L 磷酸钠，130mmol/L NaCl，0.2% EDTA，0.15mmol/L PMSF，1μg/ml 亮抑蛋白酶肽以及 1μg/ml 抑胃肽酶。

PCR 扩增缓冲液，10×

√500mmol/L KCl

√100mmol/L Tris·Cl，pH8.3

√x mmol/L $MgCl_2$

0.1%（w/v）明胶

分装保存于－20℃

此溶液可高压消毒。也可用消毒过的水和储存液配制，这样就可省略消毒步骤。

15mmol/L $MgCl_2$ 是多数 PCR 反应使用的浓度（x）。然而最佳浓度依赖于序列和引物，可能需要根据具体实验来确定。

PEG，50%（单元 4.1）

在 Wheaton 玻璃瓶中高压消毒 10g 聚乙二醇（PEG）4000（Merck 或 ATCC），冷

却。在其凝固（约55℃）前加入10ml不含血清的完全培养基DMEM（见配方）。这足够约20次融合。此溶液也许可在室温下保存数月；它将会变碱，但这不会影响其使用。

不可使用含蛋白培养基，因为PEG可使蛋白质沉淀。

PEG1500，用添加了DMSO的DMEM配制（单元13.5）

微波炉中融化42.5g聚乙二醇1500（PEG 1500），加入50ml DMEM（见配方）及10ml DMSO，用0.22μm滤膜过滤，分装后于－20℃可保存1年。

抑胃肽酶，1mg/ml（单元7.3）

10mg抑胃肽酶
10ml无水乙醇
按使用量分装
－20℃储存（至少稳定1年）
临用前解冻并混合均匀

Percoll稀释液（单元3.4）

在75ml水中加入：
171g蔗糖（终浓度2.5mol/L）
√20ml 100mmol/L Na_2EDTA（终浓度10mmol/L）
√20ml 1mol/L HEPES（终浓度100mmol/L）
用NaOH调整pH至7.0
加水至200ml
4℃可储存1～2天
对于不使用EDTA的方案，可用20ml水代替。

Percoll溶液，30%（v/v）（单元3.6）

3体积Percoll
2体积水
√5体积甘露醇缓冲液B
4℃可储存1～2天

溶于BHM的Percoll溶液（单元3.6）

将20ml Percoll加入20ml 2×BHM（见配方）中配制成50%（v/v）的Percoll储存液。4℃可保存1～2天。

配制梯度溶液：以BHM稀释50%Percoll储存液，得到15%、23%和40%（v/v）的Percoll溶液。4℃可保存1～2天。

Percoll储存液，90%（v/v）（单元3.4）

将9体积的Percoll和1体积的Percoll稀释液（根据实验方案确定用含或不含EDTA的稀释液，见配方）混合。4℃可保存1～2天。

穿孔缓冲液（单元12.3）

√50mmol/L HEPES酸，pH7.2
90mmol/L乙酸钾
4℃可储存6个月

渗透性溶液（单元 10.4）

3.5g 冷水鱼皮明胶（终浓度 0.7% w/v，Sigma-Aldrich）

0.8ml 10%（w/v）皂角甙水溶液（终浓度 0.016%）

√加 PBS 调整至 500ml

试验当天新鲜配制，不能储存

溶液量足够准备 12 个 12mm 的 Transwell 滤膜

过氧化物酶体诱导培养基（单元 3.9）

0.5%（w/v）细菌蛋白胨

0.3%（w/v）酵母提取物

0.12%（w/v）油酸

0.2%（v/v）Tween 40

0.5%（w/v）KH_2PO_4

用 NaOH 调整 pH 至 6.0

高压消毒

室温可储存数周

每个菌种至少需要 1.1L 诱导培养基。

这些配制好的培养基最好在几天内使用。

pH2.0 缓冲液（单元 10.2）

29.22g NaCl（终浓度 500mmol/L）

28.57ml 冰乙酸（0.2mol/L）

用蒸馏水调整体积至 1L

调整 pH 至 2.0

4℃可储存 6 个月

pH5.0 缓冲液（单元 10.2）

8.76g NaCl（终浓度 150mmol/L）

9.74g 2-(N-吗啉）乙磺酸（MES，50mmol/L）或 5.88g 柠檬酸钠（20mmol/L）

用蒸馏水调整体积至 1L

调整 pH 至 5.0

4℃可储存 6 个月

苯酚，TE 饱和（单元 11.4）

将苯酚暖至室温，然后在 68℃融化。加入羟基喹啉达到终浓度 0.1%，作为萃取过程中确认有机相的黄色标志。加入一定体积的 TE 缓冲液，pH8.0（见配方），与苯酚等体积，涡旋充分混匀。待两相分开，吸出上层的水相。用 TE 缓冲液重复此饱和过程 2 或 3 次，直到 TE 体积不变，苯酚相的 pH 达到 8.0（用 pH 试纸测试）。去除水相，加入 0.1 体积新鲜 TE。4℃避光可保存 1 个月。

苯二胺封固基液（单元 3.2）

√2.5ml 2×TBS

2.5ml 甘油

10ml 苯二胺（终浓度 2mg/ml）

调整 pH 至 9.5～10.5

将基液装入 5ml 注射器中，与 0.22μm 的注射器头过滤器相连，封以铝箔。新鲜配制，冰上保存。需要时将基液直接通过过滤器打至玻片上。

此基液对光很敏感。

苯二铵封固基液（单元 12.4）

将 100mg p-苯二胺（一种抗衰减剂）溶解于 10ml 1×PBS（见配方）。加入 90ml 甘油并搅拌至均匀。分装并保存于－80℃。使用前暖至室温。

长时间暴露于光将会使基液变为棕色。

苯肼，2.5%（w/v）（单元 12.1）

将 5g 苯肼（Sigma）溶解于 200ml 已抽气且消毒的 0.85% NaCl 中，用 1mol/L NaOH 调整 pH 至 7.0（溶液应为浅黄色而非棕色）。按单次使用的量分装，－20℃保存于不透气的避光容器中，可保存 3 个月。

一个分装管一旦融化使用，剩余的液体要丢弃。

磷酸酶抑制剂，10×（单元 8.4）

4mmol/L 正钒酸钠

√4mmol/L EDTA，pH8.0

100mmol/L NaF

100mmol/L 焦磷酸钠

调 pH 至 7.6

－20℃分装冻存

磷酸缓冲液（PB）（单元 14.5）

5mmol/L $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$

5mmol/L KH_2PO_4

最终 pH6.2

4℃储存 6 个月

磷酸缓冲盐溶液，亦见 PBS

磷酸缓冲盐溶液（PBS）（单元 2.1 和 10.2）

4L 蒸馏水

32g NaCl（终浓度 140mmol/L）

0.8g KH_2PO_4（终浓度 1.5mmol/L）

8.7g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$（终浓度 8.1mmol/L）

0.8g KCl（终浓度 2.7mmol/L）

用 1mol/L NaOH 调 pH 至 7.4

室温无限期储存

磷酸缓冲盐溶液（单元 4.3）

0.23g NaH_2PO_4（无水，终浓度 1.9mmol/L）

1.15g Na_2HPO_4（无水，终浓度 8.1mmol/L）

9g NaCl（终浓度 154mmol/L）
加水至 900ml
用 1mol/L NaOH 或 1mol/L HCl 调整至所需 pH
加水至 1L，室温无限期储存

磷酸缓冲盐溶液（单元 4.4）

1.1g K_2HPO_4
0.43g KH_2PO_4
9g NaCl
900ml 水
如果需要，用 1mol/L 碳酸氢钠（见配方）调 pH 至 7.2 或 7.4
加水至 1L
4℃储存 1 周
终浓度为 0.01mol/L 磷酸钾/0.15mol/L NaCl，pH7.2

磷酸缓冲盐溶液（PBS），10×（单元 12.4）

2.3mmol/L NaH_2PO_4
7.7mmol/L Na_2HPO_4
√150mmol/L NaCl
4℃可储存数月

磷酸缓冲盐溶液（PBS）（单元 12.5）

8g NaCl
0.2g KCl
0.1g $CaCl_2$
0.1g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$
1.15g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$
0.2g KH_2PO_4
加水至 1L
室温无限期储存

含 Ca/Mg 的磷酸缓冲盐溶液（PBSCM）（单元 3.8）

在 100ml 水中加入：
0.026g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$（终浓度 0.9mmol/L）
0.04g KCl（终浓度 2.68mmol/L）
0.04g KH_2PO_4（终浓度 1.47mmol/L）
√100μl 1mol/L $MgCl_2$（终浓度 0.5mmol/L）
0.16g NaCl（终浓度 0.137mol/L）
0.23g Na_2HPO_4（终浓度 8.1mmol/L）
用 NaOH 或 HCl 调整 pH 至 7.5
加水至 200ml
4℃可储存 1 周

磷酸盐凝胶缓冲液，4×(400mmol/L 磷酸钠，pH 5.8～8.0)（单元 7.2）

55.2g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$

加水至 500ml

用 1mol/L NaOH 调整 pH 至 5.8～8.0

加水至 1000ml

4℃可储存 1 个月

磷酸盐/盐溶液/EDTA（单元 13.7）

7.6g 氯化钠（终浓度 130mmol/L）

20ml 0.5mol/L 磷酸钠，pH7.7（见配方，终浓度 10mmol/L）

√25ml 0.2mol/L EDTA，pH7.0（终浓度 5mmol/L）

√1ml 20%（w/v）叠氮钠（终浓度 0.02%）

加去离子水至 1000ml

室温可储存数周

磷酸肌酸，1mol/L（单元 12.1）

将 0.255g 磷酸肌酸溶解在 1ml 冰预冷的水中，25μl 或 250μl 分装，迅速冷冻，－20℃可储存 2 周

一个分装管一旦解冻使用，剩余溶液应丢弃。

PIPES，1mol/L，pH 7.0（单元 11.5）

用 50ml 水溶解 30.24g PIPES（pH 调至≥6.7 时方可溶解），用 5mol/L KOH 调整 pH 至 7.0，加水至 100ml。

室温无限期储存。

PIPES 缓冲液（单元 11.1）

在 800ml 水中溶解：

3.02g PIPES（Calbiochem；终浓度 10mmol/L）

5.84g NaCl（终浓度 0.1mol/L）

406mg $MgCl_2$（终浓度 2mmol/L）

1ml Triton X-100（终浓度 0.1%）

用 NaOH 或 HCl 调整 pH 至 6.8

加水至 1000ml

0～4℃可储存 6 个月

PIPES/DTT 缓冲液（单元 3.9）

室温下用已消毒的水配制 100mmol/L PIPES/KOH（pH 9.4）和 1mol/L DTT 储存液。将 10ml 1mol/L PIPES/KOH（pH 9.4）与 1ml 1mol/L DTT、水混合，使终体积达到 100ml。用前新鲜配制。

每个梯度大约需要 50ml。

PIPES 裂解缓冲液（单元 3.9）

20mmol/L PIPES/KOH（pH6.8）

250mmol/L 山梨醇

100mmol/L 乙酸钾

√50mmol/L KCl

√5mmol/L $MgCl_2$

4℃储存数周

临用前加入 DTT、PMSF 和 50×PIC，终浓度分别为 2mmol/L、1mmol/L，2×，用无菌试剂配制或过滤消毒。

PI-PLC 孵育缓冲液（单元 6.1）

√100mmol/L Tris・HCl，pH7.4

√50mmol/L NaCl

√1mmol/L EDTA

0.5mol/L 甲基-α-D-甘露吡喃糖苷

新鲜配制

PM 缓冲液，2×和 1×(单元 3.9)

2×：

2.5ml 1mol/L K_2HPO_4

5.5ml 1mol/L KH_2PO_4

√0.4ml 1mol/L $MgCl_2$

加水至 200ml

过滤消毒

4℃可储存数周

1×：

用水按 1∶1 稀释 2×PM 缓冲液，4℃冷却。临用前按 1∶1000 加入 1000×蛋白酶抑制剂混合液 PIC-W 和 PIG-D（见配方）。

PMSF（苯甲磺酰氟），100mmol/L

将 0.174g PMSF 溶解于 10ml 100%乙醇、异丙醇或甲醇中。分装后－20℃可保存 1 年。

注意： 苯甲磺酰氟有毒。

每次使用必须用乙醇储存液新鲜稀释，因为在室温下 PMSF 水溶液的半衰期小于 30min，在冰上也不过几个小时。

如果 PMSF 被加入不含表面活性剂的溶液中，则加入时必须有力搅拌，因为 PMSF 在水溶液中有形成不溶沉淀的趋势。

PMSF，200mmol/L（单元 3.9）

将 34.5mg 苯甲磺酰氟（PMSF）溶解于 9ml 纯乙醇中。新鲜配制或分装后于－20℃保存几周。

PMSF 储存溶液，0.2mol/L（单元 13.6 和 13.7）

将 69.6mg PMSF（苯甲磺酰氟）溶解于 2ml 异丙醇（Sigma）中。室温下可保存数天，或分装后于－20℃可保存数年。

多聚赖氨酸包被组织培养表面

100mg 多聚赖氨酸溶于 100ml 水，配制成储存溶液（多聚-L-赖氨酸和多聚-D-赖氨

酸均可使用；异构体的选择可查阅专著），用 0.22μm 滤膜过滤消毒。5ml 分装，保存于－20℃。需要使用时，将 1 份储存液以 19 份水稀释，配制成 50μg/ml 的工作液。

包被培养皿、多孔板或小室玻片：将组织培养皿、多孔板或片上小孔注满工作液，37℃孵育 1h，而后抽真空排出溶液，将表面晾干。

包被盖片：将盖片高压消毒或以 95％乙醇浸泡后于包被前晾干。将其置于含工作液的培养皿中，摆放成单层，37℃孵育 1h。用消毒过的镊子移出盖片，晾干表面。

包被过的组织培养器皿可在 4℃保存 3 个月。稀释过的溶液只可使用一次。

丽春红 S 溶液（单元 7.7）

将 0.5g 丽春红 S 溶解于 1ml 冰乙酸中，加水至 100ml。临用前配制。

乙酸钾缓冲液，0.1mol/L

溶液 A：每升水中含 11.55ml 冰乙酸（0.2mol/L）

溶液 B：每升水中含 19.6g 乙酸钾（$KC_2H_3O_2$）（0.2mol/L）

参考表 A.1.3，为达到所需 pH，混合相应体积的溶液 A 和溶液 B，而后加水稀释至 100ml。如有需要，过滤消毒。室温可保存 3 个月。

通过在相同体积中按比例增加乙酸钠的量，可以配成 5 倍或 10 倍浓缩液。乙酸缓冲液的 pH 依赖浓度而变化，因此需取一小份浓缩液稀释至终浓度来检验 pH。

若想制备 pH 在表 A.1.3 中所列 pH 范围的缓冲液，按最接近的较高 pH 配制，然后用 A 溶液滴定。

表 A.1.3　0.1mol/L 乙酸钠和乙酸钾缓冲液的配制[a]

期望 pH	溶液 A/ml	溶液 B/ml
3.6	46.3	3.7
3.8	44.0	6.0
4.0	41.0	9.0
4.2	36.8	13.2
4.4	30.5	19.5
4.6	25.5	24.5
4.8	20.0	30.0
5.0	14.8	35.2
5.2	10.5	39.5
5.4	8.8	41.2
5.6	4.8	45.2

a. 经许可改编自 CRC（1975）。

乙酸钾缓冲液（单元 12.3）

√20mmol/L HEPES 酸，pH7.4

210mmol/L 乙酸钾

3mmol/L 乙酸镁

－20℃可储存 6 个月

磷酸钾缓冲液，0.1mol/L

溶液 A：每升水中含 27.2g KH_2PO_4（终浓度 0.2mol/L）

溶液 B：每升水中含 34.8g K_2HPO_4（终浓度 0.2mol/L）

参考表 A.1.4，为达到所需 pH，混合相应体积的溶液 A 和溶液 B，而后加水稀释至 200ml。如有需要，过滤消毒。室温可保存 3 个月。

通过在相同体积中按比例增加磷酸钾的量，可以配成 5 倍或 10 倍浓缩液。磷酸缓冲液的 pH 依赖浓度而变化，因此需取一小份浓缩液稀释至终浓度来检验 pH。

若想制备 pH 在表 A.1.4 中所列 pH 范围的缓冲液，按最接近的较高 pH 配制，然后用 A 溶液滴定。

表 A.1.4　0.1mol/L 磷酸钠和磷酸钾缓冲液的配制[a]

期望 pH	溶液 A/ml	溶液 B/ml	期望 pH	溶液 A/ml	溶液 B/ml
5.7	93.5	6.5	6.9	45.0	55.0
5.8	92.0	8.0	7.0	39.0	61.0
5.9	90.0	10.0	7.1	33.0	67.0
6.0	87.7	12.3	7.2	28.0	72.0
6.1	85.0	15.0	7.3	23.0	77.0
6.2	81.5	18.5	7.4	19.0	81.0
6.3	77.5	22.5	7.5	16.0	84.0
6.4	73.5	26.5	7.6	13.0	87.0
6.5	68.5	31.5	7.7	10.5	90.5
6.6	62.5	37.5	7.8	8.5	91.5
6.7	56.5	43.5	7.9	7.0	93.0
6.8	51.0	49.0	8.0	5.3	94.7

a. 经许可改编自 CRC（1975）。

预处理缓冲液（单元 3.9）

√100mmol/L Tris·Cl，pH9.4

√50mmol/L DTT

√5mmol/L EDTA，pH9.0

用无菌的储存液于室温新鲜配制

引物扩增混合液（1ml）（单元 12.9）

将 62.5μl 2mg/ml 的放射菌素 D 乙醇溶液蒸发干。加入 886μl 水，然后再加入 62.5μl 1mol/L 的 Tris·Cl，pH8.3（见配方）。涡旋振荡使放线菌素 D 溶解。加入 12.5μl 100mmol/L 的 $MnCl_2$（不要用 1mol/L 的储存液）。再加入各种 10mmol/L dTNP 各3.5μl（共 14μl），再次涡旋振荡。最后加入 25μl 0.5mol/L 的 DTT（见配方）。

碘化丙啶（PI）染色液 I（单元 11.1）

在 100ml 含 0.1%（v/v）Triton X-100 的 PBS 中，加入 20mg 不含 DNA 酶的 RNA 酶 A 和 2mg 碘化丙啶（PI；Molecular Probes）。4℃避光可保存 2 周。

碘化丙啶（PI）染色液 II（单元 11.1）

将 2mg 碘化丙啶（PI；Molecular Probes）加入 100ml PIPES 缓冲液中（见配方）。在暗处或在箔包裹的瓶中存放，0～4℃可保存数周。使用前加入不含 DNA 酶的 RNA

酶 A 达到 200μg/ml 的终浓度。

碘化丙啶染色液 III（单元 11.1）

√磷酸缓冲盐溶液（PBS，见配方）中包含：
5μg/ml 碘化丙啶（PI）
200μg/ml 不含 DNA 酶的 RNA 酶 A
新鲜配制

蛋白酶抑制剂混合液（PIC），50×(单元 3.9)

√10μl 亮抑蛋白酶肽（0.5mg/ml 水溶液）
50μl 1，10-邻二氮（杂）菲（500mmol/L 溶于乙醇）
√25μl 抑胃肽酶 A（1mg/ml 溶于甲醇）
50μl Pefabloc（100mmol/L 溶于水）
865μl 无菌水
彻底混匀，等量分装，−80℃储存数月
临用前，用所需缓冲液 1∶50 或 1∶25 稀释

蛋白酶抑制剂混合液（PIC），100×（单元 12.3）

√1mg/ml 亮抑蛋白酶肽
1mg/ml 胰凝乳蛋白酶抑制剂
√0.05mg/ml 抑胃肽酶 A
√0.05mol/L 苯甲磺酰氟（PMSF）
用前以水稀释储存液新鲜配制，储存液储存于−20℃

蛋白酶抑制混合剂（PIC）500×和1000×（单元3.9）

500× PIC-A：5mg/ml 抗痛素、1mg/ml 亮抑蛋白酶肽、1mg/ml 抑蛋白酶肽溶于水，1ml 分装，−20℃可保存数月。

500× PIC-B：5mg/ml 抑胃肽酶 A、5mg/ml 的胰凝乳蛋白酶抑制剂溶于甲醇中，1ml 分装，−20℃可储存数月。

1000× PIC-D：880mg 苯甲磺酰氟（PMSF；终浓度为 0.5mol/L）、10mg 抑胃肽酶 A、10mg 胰凝乳蛋白酶抑制剂溶解在 10ml 的二甲基亚砜（DMSO）中，1ml 分装，−20℃可储存数月。

1000× PIC-W：1.5g 苯甲脒（终浓度 1mol/L）、131mg ε-氨基己酸（终浓度 1mol/L）、5mg 抑氨肽酶、5mg 亮抑蛋白酶肽溶于 10ml 水，1ml 分装，−20℃可储存数月。

临用前，用所需缓冲液按 1∶1000 稀释 PIC 溶液。在液面之下加 PIC-D，同时用力混匀将沉淀减少到最少。

蛋白酶抑制混合溶液 A（单元 3.9）

5mg/ml α-巨球蛋白溶于水（可选用，如用 DTT 则忽略）
√200mmol/L PMSF 溶于纯乙醇（200×）
−20℃储存数周

蛋白酶抑制剂混合溶液 B（单元 3.9）

√100mmol/L PMSF 溶于纯乙醇（100×）

√1mg/ml 抑胃肽酶溶于甲醇（1000×）
√1mg/ml 亮抑蛋白酶肽溶于水（1000×）
-20℃储存几周

蛋白酶抑制剂储存溶液 C（单元 3.9）

100mmol/L PMSF，纯乙醇配制
100mmol/L *N*-甲苯磺酰基-L-苯丙氨酸氯甲基酮（TPCK），纯乙醇配制
2.5mg/ml 抑胃肽酶 A，甲醇配制（1000×）
分装蛋白酶抑制剂储存液
-20℃储存数月

蛋白酶抑制剂（单元 3.6 和 3.7）

在溶液中加入下列物质，使 PMSF 终浓度为 1mmol/L，每种抑制剂终浓度为 2.0μl/ml
PMSF：
0.348g 苯甲磺酰氟（终浓度 20mmol/L）
10ml 异丙醇或乙醇，挥发干
4℃可储存 2～3 个月
抗痛素：
10mg 抗痛素（终浓度 1mg/ml）
10ml 10%（v/v）二甲基亚砜（DMSO）
分装，-20℃可储存 2～3 个月
抑蛋白酶肽：
10mg 抑蛋白酶肽（终浓度 1mg/ml）
10ml 水
分装，-20℃可储存 2～3 个月
亮抑蛋白酶肽：
10mg 亮抑蛋白酶肽（终浓度 1mg/ml）
10ml 10%（v/v）的二甲基亚砜
分装，-20℃可储存 2～3 个月

蛋白酶抑制溶液（单元 3.2）

抗痛素：配制 5ml 的水溶液，内含 5mg 抗痛素（终浓度 1mg/ml）和 10%（v/v）的二甲基亚砜（DMSO）。

等量分装，-20℃可冻存 1 年。临用前 1∶1000 稀释（终浓度 1μg/ml）。

抑蛋白酶肽：配制 10ml 的水溶液，内含 13.6mg 抑蛋白酶肽（终浓度 1.36mg/ml）。4℃可储存 1 年，临用前 1∶200 稀释（终浓度 6.8mg/ml）。

苯甲脒：配制 10ml 的水溶液，内含 0.313g 苯甲脒（终浓度 200mmol/L）。等量分装，-20℃可冻存 1 年。临用前 1∶200 稀释（终浓度 1mmol/L）。

亮抑蛋白酶肽：配制 5ml 水溶液，内含 5mg 亮抑蛋白酶肽（终浓度 1mg/ml）和 10%（v/v）DMSO。等量分装，-20℃可冻存 1 年。临用前 1∶1000 稀释（终浓度

1μg/ml）。

苯甲磺酰氟（PMSF）：10ml 的 100%乙醇溶液中含 0.348g PMSF（终浓度 200mmol/L），4℃储存无限期，临用前 1∶200 稀释（终浓度 1mmol/L）。

蛋白 A-琼脂糖（单元 8.6）

将 0.4g 蛋白 A-琼脂糖 CL-4B（Pharmacia）浸泡于 11.2ml 10mmol/L 的 Tris·Cl（pH7.5）/1mmol/L 叠氮钠/1mg/ml 的牛血清白蛋白溶液中，置于 4℃2h 或过夜使之膨胀。待凝胶颗粒沉降后吸弃上清，补加新的缓冲液到原来的体积，4℃可存放 3 个月。

蛋白酶缓冲液（用于处理塞子）（单元 11.4）

10mmol/L NaCl

10mmol/L Tris·Cl pH9.5

25mmol/L EDTA

加十二烷基肌氨酸（Sarkosyl）至 1%（w/v）终浓度，用磁力搅拌器使之完全溶解，测 pH，如果需要，用 NaOH 调 pH 至 9.5，0.22μm 滤器过滤除菌，4℃储存。

蛋白校准标准品（单元 6.3）

可用作标准品的蛋白质如表 6.3.3 所示。用合适的溶剂溶解每种蛋白质使之浓度达 0.5mg/ml，0.22μm 滤器过滤。

有些蛋白质溶液可于—20℃保存数月，但有些蛋白质不稳定，必须新鲜配制。这要根据试验和误差来确定。

为节省时间，可将两种或两种以上的标准蛋白同时跑，只要吸收峰各自独立，就可将它们混在一起。

PSM I 溶液（单元 3.9）

1.6ml 1mol/L K_2HPO_4

2.4ml 1mol/L KH_2PO_4

√0.2ml 1mol/L $MgCl_2$

17.12g 超纯蔗糖（终浓度 250mmol/L）

加水至 200ml

过滤消毒

4℃可保存数周

脉冲标记培养基（单元 8.1）

使用含添加剂的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基（DMEM；见配方，但不含非必需氨基酸）或 RPMI-1640（见配方），每种都缺乏甲硫氨酸或其他特定的氨基酸，但是含有 10%（v/v）FBS（经过盐溶液透析过夜，去除未标记的氨基酸），添加 25mmol/L HEPES 缓冲液（NaOH 调 pH 至 7.4）4℃可存放 2 周。

这种培养基中必须去掉用于标记细胞的氨基酸（例如，如果使用^{35}S 甲硫氨酸，就必须用不含甲硫氨酸的 DMEM 或 RPMI 1640），不含某种特殊氨基酸的培养基可从好几家组织培养基供应商处得到，或可配制（见表 A.1.2），即在去氨基酸培养基中加入各种氨基酸成分，但不加入用于标记的氨基酸。用于制备这种培养基的试剂盒也可使用（Life Technologies 的 Seleect-Amine）。

淬火缓冲液（单元 12.7）

√20ml 5× BRB80（终浓度 2×）

20ml 甘油（终浓度 40% v/v）

5ml 1mol/L 谷氨酸钾（终浓度 100mmol/L）

加水至 50ml

使用当天新鲜配制

淬火溶液（单元 10.4）

1.5ml 1mol/L NH_4Cl（终浓度 75mmol/L）

0.4ml 1mol/L 甘油（终浓度 20mmol/L）

√ 18.1ml PBS

总体积达 20ml

实验当天新鲜配制，不能储存

RD 培养基，含添加物（单元 1.2）

RPMI 1640 和 DMEM 按 1∶1 混合（见表 A.1.2），加入谷氨酰胺至 2mmol/L、青霉素 G 至 100IU/ml、链霉素至 50μg/ml。过滤除菌，4℃存放，用时加适量血清。

反应缓冲液（单元 4.4）

11.5g Na_2HPO_4

2.6g NaH_2PO_4

5.8g NaCl

900ml 水

5mol/L NaOH 调 pH 至 7.5

加水至 1L

4℃保存 2 周

用于标记 IgM，调 pH 至 7.2

还原缓冲液（单元 7.3）

0.5g 二硫苏糖醇（DTT）

0.1g SDS

1.51g Tris 碱

用 HCl 调至 pH6.8

加水至 100ml

每次使用新鲜配制

终浓度是 0.5%（w/v）DTT，0.1%（w/v）SDS，125mmol/L Tris·Cl，pH6.8

复制终止缓冲液（单元 12.5）

√80mmol/L Tris·Cl，pH8.0

√8mmol/L EDTA

0.13%（v/v）磷酸

10%（w/v）Ficoll

√5%（w/v）SDS

0.2%（w/v）溴酚蓝
－20℃保存

重悬浮缓冲液（单元12.3）

√20mmol/L HEPES酸，pH7.4
0.25mmol/L蔗糖
－20℃可保存6个月

重悬浮缓冲液（单元12.9）

√15mmol/L HEPES（钾盐），pH7.6
√110mmol/L KCl
√5mmol/L $MgCl_2$
√0.1mmol/L EDTA
4℃可保存1个月
临用前加：
√2mmol/L DTT
1mmol/L亚硫酸钠
√0.2mmol/L PMSF（亦见附录2B）
1mmol/L苯甲脒

网织红细胞清洗缓冲液Ⅰ（单元12.1）

√100ml 10×网织红血胞清洗缓冲液Ⅱ
√7.5ml 1mol/L $MgCl_2$
10ml 100mmol/L蔗糖
加水至1L
4℃可保存1年

网织红细胞清洗缓冲液Ⅱ 10×（单元12.1）

38.5g NaCl
1.875g KCl
加水至500ml
高压灭菌，4℃可保存1年

使用前加100ml 10×储存液、5ml 1mol/L HEPES-KOH，pH7.2（见配方）至900ml消毒的水中。

核糖核苷-5′-三磷酸（rNTP），5mmol/L（单元12.9）

用缓冲液（作者使用20mmol/L磷酸钠缓冲液，pH7.5，但其他如磷酸钾、Tris和HEPES也可用）稀释100mmol/L每一种rNTP储存液（Amersham Biosciences）至终浓度5mmol/L。－70℃可保存1年

旺盛生长培养基（单元3.9）

0.67%（w/v）不含氨基酸的酵母氮源
0.1%（w/v）酵母提取物

0.3% (w/v) 葡萄糖

高压灭菌。培养基冷却后立即加入需要的氨基酸（通常终浓度是20μg/ml）。室温可储存几周。

每株菌至少需要350ml生长培养基。

RIPA 缓冲液（单元9.3和9.2）

√20mmol/L Tris·Cl，pH7.4

√137mmol/L NaCl

10%（v/v）甘油

√0.1%（w/v）SDS

0.5%（w/v）脱氧胆酸钠

√1% Triton X-100

√2.0mmol/L EDTA

√1.0mmol/L PMSF（新鲜加入）

√20mmol/L 亮抑蛋白酶肽

4℃可保存3个月

RIPA 校正缓冲液（单元9.1）

1.25%（w/w）乙基苯基聚乙二醇 P-40（NP-40）

1.25%（w/v）脱氧胆酸钠

√0.0125mol/L 磷酸钠，pH7.2

√2.0mmol/L EDTA

0.2mmol/L 钒酸钠，新鲜加入0.2mol/L储存液来配制

50mmol/L 氟化钠

100U/ml 抑蛋白酶肽（Trasylol，Pentex/Miles）

不含钒酸的缓冲液可在4℃保存1年

钒酸钠储存液可室温保存在塑料容器中。

RIPA 裂解缓冲液（用于放射免疫沉淀分析）（单元8.3）

1%（w/w）乙基苯基聚乙二醇 P-40（NP-40）

1%（w/v）脱氧胆酸钠

√0.1%（w/v）SDS

√0.15mol/L NaCl

√0.01mol/L 磷酸钠，pH7.2

√2mmol/L EDTA

√10mmol/L 氟化钠

0.2mmol/L 钒酸钠，新鲜加入0.2mol/L储存液来配制

100U/ml 抑蛋白酶肽（Trasylol，Pentex/Miles）

不含钒酸的缓冲液可在4℃保存1年

钒酸钠储存液存放于塑料容器中，室温保存。

RIPA 裂解缓冲液（单元9.1）

1%（w/w）乙基苯基聚乙二醇 P-40（NP-40）

1% (w/v) 脱氧胆酸钠
√0.1% (w/v) SDS
√0.15mol/L NaCl
√0.01mol/L 磷酸钠，pH7.2
√2mmol/L EDTA
50mmol/L 氟酸钠
0.2mmol/L 钒酸钠，新鲜加入 0.2mol/L 储存液来配制
100U/ml 抑蛋白酶肽（Trasylol，Pentex/Miles）
不含钒酸的缓冲液可在 4℃保存 1 年
钒酸钠储存液存放于塑料容器，室温保存。

RM×3（单元 9.3）

75mmol/L 的 β-磷酸甘油，pH7.3
√30mmol/L $MgCl_2$
√0.9% w/v BSA
√3mmol/L DTT
√3mmol/L EGTA
0.3mmol/L 正钒酸钠
100μmol/L [γ-^{32}P] ATP（约 4000cpm/pmol）
不含 [γ-^{32}P] 的 ATP 的溶液－20℃可以保存 1 年

RM×3 中最重要的成分是 Mg^{2+} 和 [γ-^{32}P] ATP，因为它们对于磷酸化反应是必需的。使用 100μmol/L 的 ATP（含约 4000cpm/pmol 的 [γ-^{32}P] ATP）可保证良好的线性关系和可重复性。如果因为激酶的酶活性过低而导致磷酸化检测有困难时，可以将非标记 ATP 的浓度降至 10～20μmol/L，将 [γ-^{32}P] ATP 的浓度升至 50 000cpm/pmol。但是并不主张单纯增加 [γ-^{32}P] ATP 浓度，因为这会引起 ATP 毫微摩尔浓度改变，使 ATP 的 K_M 值降低导致非特异的磷酸化反应。

50mg/ml 的 RNA 酶 A（单元 11.4）

用 10mmol/L Tris・Cl pH7.5（见配方）/15mmol/L NaCl（见配方）溶解 RNA 酶 A（如 Sigma）至终浓度为 50mg/ml，50℃加热 15min，冷却至室温，等量分装，－20℃可以保存数月。

RNA 酶 T1/A 储存液

将 50μl 500 000U/ml 的 RNA 酶 T1 和 50mg RNA 酶 A 混合溶于 5ml 10mmol/L 的 Tris・Cl，pH7.5（见配方）/15mmol/L NaCl（见配方）中，50℃加热 15min，冷却至室温，等量分装，－20℃可以保存数月。

RPMI 1640

见表 A.1.2

样品缓冲液（单元 3.6）

2g Triton X-100（终浓度 2% w/v）
加水至 100ml

将1体积此溶液和2体积Tris/BSA溶液混合（见配方）

4℃可储存1～2天

样品缓冲液，2×(单元7.5)

√20ml 10×TAE

√1ml 20%（w/v）SDS

20ml 甘油

0.2g 溴酚蓝

加水至200ml

室温可储存1年

皂角甙，10%（w/v）

1g的皂角甙溶于10ml PBS（见配方），500μl分装，－20℃保存。

一旦溶解，此溶液在4℃条件下可以稳定数月。

SDS，20%（w/v）

20g SDS（十二烷基硫酸钠）溶于水，定容到100ml，搅拌充分溶解，用0.45μm滤器过滤除菌。

必要时小心加热使之完全溶解。

SDS电泳缓冲液，5×（单元7.1）

15.1g Tris碱（终浓度0.125mol/L）

72.0g 甘油（终浓度0.96mol/L）

5.0g SDS（终浓度0.5% w/v）

加水至1000ml

稀释至1×或2×工作液

勿调整储存溶液的pH，因为稀释后溶液pH为8.3。0～4℃储存至使用（最多1个月）。

SDS裂解缓冲液（单元9.1）

√0.5%（w/v）SDS

√0.05mol/L Tris·HCl，pH8.0

√1mmol/L DTT，新鲜加入

SDS和Tris·HCl溶液可预先配制并储存于室温，加入的DTT取自－20℃储存的1mol/L储存液

SDS裂解缓冲液，0.5%(w/v)(单元10.4)

√12.5ml 4mol/L NaCl（终浓度100mmol/L）

25ml 1mol/L TEA·Cl，pH8.1（终浓度50mmol/L）

√5ml 0.5mol/L EDTA，pH8.0（终浓度5mmol/L）

1ml Trasylol（终浓度0.2% v/v）

√1.0ml 10% NaN_3（终浓度0.02% v/v）

√25ml 10% SDS（终浓度0.5% w/v）

475ml 水

总量 500ml

室温储存 6 个月

SDS-PAGE 样品缓冲液，2× (50ml)

成分	2×储存液的浓度
√12.5ml 1mol/L Tris·HCl，pH6.8	250mmol/L
3g SDS	6%
2.3g DTT	300mmol/L
5ml 2-巯基乙醇	1.4mol/L
500μl 2%溴酚蓝	0.02%
20ml 甘油	20%

加水至 50ml

过滤，1ml 分装，−20℃可储存 1 年

一旦解冻使用，弃去残留液。

SDS-PAGE 样品缓冲液，4× (单元 9.2 和 9.3)

√200mmol/L Tris·HCl，pH6.8

40%（v/v）甘油

√8%（w/v）SDS

0.2%（w/v）溴酚蓝

8%（v/v）2-巯基乙醇

−20℃可储存 12 个月

SDS-PAGE 样品缓冲液，5×(单元 13.4)

25%（v/v）甘油

√125mmol/L Tris·Cl，pH6.8

√10%（w/v）SDS

0.1%（w/v）溴酚蓝

4℃无限期储存

使用前用热水浴加温并混匀。

SDS 样品缓冲液

在 200ml 水中加入：

31.25ml Tris 碱（终浓度 62.5mmol/L）

√1ml 0.5mol/L EDTA，pH7.4（终浓度 1mmol/L）

用浓盐酸调节至 pH6.8

加 10g SDS（终浓度 2%）

√250ml 8mol/L 尿素（终浓度 4mol/L）

加水至 500ml

4℃可保存 3 个月

临用前在每 950μl 中加 50μl 2-巯基乙醇。

SDS 样品缓冲液

见表格 A.1.5

表格 A.1.5 SDS 样品缓冲液的配制

组分	2×	4×	1×缓冲液的终浓度
0.5M Tris·Cl，pH6.8[a]	2.5ml	5.0ml	62.5mmol/L
SDS	0.4g	0.8g	2%（w/v）
甘油	2.0ml	4.0ml	10%（v/v）
溴酚蓝	20mg	40mg	0.1%（w/v）
巯基乙醇[b,c]	400μl	800μl	约 300mmol/L
H_2O	加至 10ml	加至 10ml	—

a. 见配方。

b. 终浓度 100mmol/L 的 DTT 可以替代 2-巯基乙醇。

c. 临用前配制。

SDS 样品缓冲液，2×（非连续系统）（单元 7.1）

25ml 4×Tris·Cl/SDS，pH6.8（表 7.1.1）

20ml 甘油（终浓度 20%）

4g SDS（终浓度 4%）

2ml 2-ME 或 3.1g DTT（终浓度 0.2% 2-ME 或 0.2mol/L DTT）

1mg 溴酚蓝（终浓度 0.001%）

加水至 100ml，混匀

1ml 分装，－70℃储存

为避免蛋白质还原为亚基（如果需要），可省去 2-ME 或 DTT（还原剂），加 10mmol/L 碘乙酰胺以抑制二硫键交换。

SDS 样品缓冲液，3×（单元 11.5）

√30ml 0.5mol/L Tris·Cl，pH6.8，室温 20℃（终浓度 150mmol/L）

45g 蔗糖（终浓度 45%，w/v）

√6ml 0.1mol/L K-EDTA，pH7.4（终浓度为 6mmol/L）

√30ml 20%（w/v）SDS（终浓度 9%）

6ml 0.5%（w/v）溴酚蓝（终浓度 0.03%）

加水至 100ml

3ml 分装，－20℃储存

临用前加 0.1 体积 2-巯基乙醇（2-ME；终浓度 10%）。

SDS 样品缓冲液（非连续系统），5×（单元 8.3）

√3.125ml 1mol/L Tris·Cl，pH6.8（终浓度 0.313mol/L）

1g SDS（终浓度 10%，w/v）

5mg 溴酚蓝（终浓度 0.05%，w/v）

5ml 甘油（终浓度 50% v/v）

加水至 10ml

室温储存

临用前加入 DTT 至适宜浓度

溶液容易固化，使用前加温。

SDS 样品缓冲液，6×(非连续系统)（单元 7.1 和 7.3）

7ml 4×Tris·Cl/SDS，pH6.8（表 7.1.1）

3.0ml 甘油（终浓度 30%，v/v）

1g SDS（终浓度 10% w/v）

0.93g DTT（终浓度 0.6mol/L）

1.2mg 溴酚蓝（终浓度 0.012%，w/v）

加水至 10ml（如果需要）

0.5ml 分装，－70℃储存

含 NaOH 的 SDS 样品缓冲液，3×（单元 6.1）

√150mmol/L Tris·Cl，pH6.8

√300mmol/L 二硫苏糖醇

√6%（w/v）SDS

0.3%（w/v）溴酚蓝

30%（w/v）甘油

30mmol/L NaOH

临用前加 1mol/L NaOH 至终浓度 100mmol/L

－20℃可储存几个月

SDS/尿素缓冲液（单元 8.6）

√50mmol/L Tris·Cl，pH7.5

√1mmol/L EDTA

√1%（w/v）SDS

√6mol/L 尿素

室温可储存 1 个月

半合成乳酸盐培养基（单元 3.9）

在总体积 2.5L 中含有：

15g 酵母提取物

2.5g 葡萄糖

2.5g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$

2.5g NaCl

3g $MgCl_2 \cdot 2H_2O$

5g KH_2PO_4

5g NH_4Cl

220ml 90%（w/v）DL-乳酸

40g NaOH

加水定容至 5L

高压灭菌

室温保存数周

此培养基最好在使用前几天配制。

无血清（SF）培养基（单元 10.2）

如果实验需要在 CO_2 培养箱中孵育，SF 培养基就是用于细胞生长的那种培养基（如 Ham's F12、DMEM、RPMI 1640，见表 A.1.2），其中添加了碳酸氢钠（依据各种培养基配方所推荐的量）和 10mmol/L 的 HEPES（pH7.2）。许多利用此培养基的实验操作在室温环境进行，加 HEPES 可以保证在这些操作过程中，以碳酸氢盐缓冲的培养基不至过碱。如果实验是在空气培养箱中进行，SF 培养基中则可以不加碳酸氢钠。

硝酸银溶液（单元 7.6）

0.2g 硝酸银溶于 100ml 水，加入 75μl 37%的甲醛，避光，用前新鲜配制。

注意：甲醛有毒性及致癌性，要戴手套，取浓甲醛（37%）时要在化学通风橱中进行。

溶液变浊时丢弃不要。

分子筛色谱法（SEC）过柱缓冲液（单元 13.11）

1g SDS（终浓度 0.1% w/v）
20.47g NaCl（终浓度 0.35mol/L）
6.06g Tris 碱（终浓度 50mmol/L）
1.25g *N*-乙基马来酰胺（NEM；终浓度 10mmol/L）
7.44g EDTA（终浓度 20mmol/L）
加水至 900ml
加温溶解
1mol/L HCl 调至 pH8.0
加入 1ml 0.2mol/L 溶于乙醇的苯甲磺酰氟（PMSF；见配方），同时迅速旋涡混匀防止沉淀（终浓度 0.2mmol/L）
加水至 1L
室温可保存 2 周

SM 平板（单元 14.5）

10g 右旋糖酐（终浓度 55mmol/L）
10g Difco 细菌用蛋白胨（终浓度 1% w/v）
1g 酵母提取物（终浓度 0.1% w/v）
1.9g KH_2PO_4（终浓度 13.9mmol/L）
0.9g K_2HPO_4（终浓度 5.2mmol/L）
20g Difco Bacto 琼脂（终浓度 2% w/v）
加水至 1L
最终 pH6.4
液体循环高压消毒 20min
每个 100mm 直径培养皿加 25ml
室温下凝固
4℃可保存 6 个月

乙酸钠，3mol/L

408 g 三水合乙酸钠（$NaC_2H_3O_2 \cdot 3H_2O$）溶于 800ml 水，用 3mol/L 乙酸（见表

A.1.1）调至 pH4.8、5.0 或 5.2（按要求），加水至 1L，高压灭菌。

乙酸钠缓冲液，0.1mmol/L

溶液 A：每升水中含 11.55ml 冰乙酸（0.2mol/L）

溶液 B：每升水中含 27.2g 乙酸钠（$NaC_2H_3O_2 \cdot 3H_2O$）（0.2mol/L）

参考表 A.1.3，为达到所需 pH，混合相应体积的溶液 A 和溶液 B，而后加水稀释至 100ml。如有需要，可过滤消毒。室温可保存 3 个月。

通过在相同体积中按比例增加乙酸钠的量，可以配成 5 倍或 10 倍浓缩液。乙酸缓冲液的 pH 依赖浓度而变化，因此需取一小份浓缩液稀释至终浓度来检验 pH。

若想制备 pH 在表 A.1.3 中所列 pH 范围的缓冲液，按最接近的较高 pH 配制，然后用 A 溶液滴定。

叠氮钠，20%（w/v）（单元 13.6）

20g 叠氮钠（Sigma）溶于 100ml 水，室温保存数月。

碳酸氢钠，1.0mol/L（单元 4.4）

8.3g $NaHCO_3$

100ml 水

4℃保存 2 周

这时 pH 一般为 8.3～8.5，也可以根据需要调至 9.0

此溶液可用来升高 PBS 的 pH。

磷酸钠，pH7.7，0.5mol/L（单元 13.7）

79.7g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$

4.29g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$

加去离子水至 1000ml

磷酸钠缓冲液，0.1mol/L

溶液 A：27.6g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 溶于 1L 水（终浓度 0.2mol/L）

溶液 B：53.65g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 溶于 1L 水（终浓度 0.2mol/L）

参考表 A.1.4，为达到所需 pH，混合相应体积的溶液 A 和溶液 B，而后加水稀释至 200ml。如有需要，可过滤消毒。室温可保存 3 个月。

通过在相同体积中按比例增加磷酸钠的量，可以配成 5 倍或 10 倍浓缩液。磷酸缓冲液的 pH 依赖浓度而变化，因此需取一小份浓缩液稀释至终浓度来检验 pH。

若想制备 pH 在表 A.1.4 中所列 pH 范围的缓冲液，按最接近的较高 pH 配制，然后用溶液 A 滴定。

助溶缓冲液（单元 13.11）

√10ml Triton X-100（终浓度 1% v/v）

240g 尿素（终浓度 4mol/L）

3.03g Tris 碱（终浓度 25mmol/L）

1.25g *N*-乙基马来酰胺（NEM；终浓度 10mmol/L）

7.44g EDTA（终浓度 20mmol/L）

0.783g 苯甲脒·Cl（终浓度 5mmol/L）

13.12g ε-氨基己酸（终浓度 0.1mol/L）

加水至 900ml

加热助溶

用 1mol/L HCl 调节至 pH7.5

加入 1ml 0.2mol/L 的苯甲磺酰氟（PMSF；见配方）乙醇溶液，迅速涡旋振荡，防止沉淀（终浓度 0.2mmol/L）

加水至 1L

4℃可保存 1 天

山梨醇/磷酸盐溶液，1.2mol/L（单元 3.9）

√50mmol/L 磷酸钾溶液，pH7.5

√1mmol/L EDTA，pH7.5

使用无菌的储存液配制，高压灭菌或过滤除菌

4℃保存数月

山梨醇溶液，1.1mol/L（单元 3.9）

50g 超纯山梨醇溶于水，稀释至 250ml。高压灭菌，4℃可保存几个月。

Sorensen 磷酸缓冲液，17mmol/L，pH6.2（单元 14.1）

10×储存液：

20.6g/L KH_2PO_4

5.05g/L $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$

室温或 4℃保存（可至少稳定保存 1 个月）

使用前，稀释至 1×，并加入 1mmol/L $MgCl_2$ 和 0.2mmol/L 的 $CaCl_2$。

大豆胰蛋白酶抑制剂溶液，0.5%（w/v）（单元 13.3）

50mg 大豆胰蛋白酶抑制剂（Sigma）

√加 HCMF 至 10ml

分装成每管 100μl

−20℃保存≤1 个月

原生质体匀浆基液（单元 3.5）

100ml 水中加入：

21.9g 甘露醇（终浓度 0.6mol/L）

√40ml 100mmol/L HEPES（终浓度 20mmol/L）

用 KOH 调节 pH 至 7.4

加水至总体积 200ml

4℃保存 1～2 天

临用前加入 1ml 200mmol/L 苯甲磺酰氟（PMSF；终浓度 1mmol/L；见配方）

原生质体培养基 A，pH7.5（单元 3.9）

1×酵母氮源（YNB；Difco）

2%（w/v）葡萄糖

1×氨基酸

1mol/L 山梨醇

√20mmol/L Tris·Cl，pH7.5

室温可保存数周

使用无菌储存液配制或者过滤除菌。

原生质体培养基 B（单元 3.9）

1×酵母氮源（YNB；Difco）

2%（w/v）葡萄糖

1×氨基酸

1mol/L 山梨醇

室温可保存数周

原生质体回收培养基（单元 3.9）

1mol/L 山梨醇

1%（w/v）细菌用蛋白胨（Difco）

1%（w/v）葡萄糖

0.5%（w/v）细菌用酵母提取物（Difco）

√20mmol/L 磷酸钾，pH6.5

室温可储存数周

原生质体/终止溶液，2×（单元 8.6）

2mol/L 山梨醇

√50mmol/L Tris·Cl，pH7.5

√40mmol/L NaN_3

40mmol/L NaF

室温可保存 6 个月

临用前加入 20mmol/L DTT，取自 1mol/L 的储存液（见配方）。

纺锤体固定剂（单元 12.7）

600μl 80%甘油（终浓度 48% v/v）

300μl 37%甲醛（终浓度 11% v/v）

√100μl 10×MMR（终浓度为 1×）

0.5μl 10mg/ml Hoechst 染液（终浓度 5μg/ml；Sigma）

室温可保存 1 周

最好在使用当天新鲜配制。

沉降铺垫液，40%，25%（单元 12.7）

200ml 甘油（终浓度 40% v/v）

√100ml 5×BRB80（终浓度 1×）

加水至 500ml

过滤除菌

4℃可保存 1 年

配制 25%的沉降缓冲液，只需加入 125ml 甘油。

沉降稀释缓冲液，30%，15%（单元12.7）

30ml 甘油（终浓度 30% v/v）

√1ml Triton X-100（终浓度 1% v/v）

√20ml 5×BRB80（终浓度 1×）

加水至 100ml

室温可保存 1 年

配制 15%的沉降稀释缓冲液，只需加入 15ml 甘油。

染色缓冲液（单元11.4）

54.2μl 水

25μl 20×二甲砷酸钠储存液

20μl blotto（25% w/v 低脂奶粉溶于 PBS）

0.7μl 卵白素-FITC（160×）

0.1μl Triton X-100

4℃可保存数周

标准蛋白质溶液，3mg/ml（附录3A）

蛋白质称重，采用与被测试蛋白质样品相同的溶剂配制蛋白质储存液，浓度为 3mg/ml，−20℃可保存 3 个月。

配制校准标准液，用同样的溶剂稀释储存液至标准曲线所需的浓度。

牛血清白蛋白（BSA，组分Ⅴ，Sigma）常被用于蛋白质标准液的配制。3mg/ml 的 BSA 溶液的 A_{280} 应为 1.98，1%的蛋白质标准液的 A_{280} 为 6.61。

对纯化或部分纯化的蛋白质做定量分析，如有可能，蛋白质标准品中应含有与待测样品相似的芳香族氨基酸的量。

STM（蔗糖/Tris/$MgCl_2$）溶液，0.25mol/L（单元3.2）

17.12g 蔗糖（终浓度 0.25mol/L）

√2.0ml 1.0mol/L Tris·Cl，pH7.4（终浓度 10mmol/L）

√0.2ml 1.0mol/L $MgCl_2$（终浓度 1.0mmol/L）

加水至 200ml

调pH 至 7.4，于室温测定密度（折射指数），0.22μm 的滤膜过滤除菌，4℃可储存 48h。

折射指数=1.3453±0.0005。溶液也可在−20℃储存 1 年，但用前应检查 pH 和密度。

STM 溶液，2.0mol/L（单元3.2）

以配制 0.25mol/L STM 溶液（见配方）相同的方法配制，但每 100ml 加 68.4g 蔗糖（终浓度 2.0mmol/L），用孔径 1.2μm 硝酸纤维膜过滤。

折射指数=1.4295±0.0005。

储存过氧化物溶液（单元3.6）

0.67g 30%（w/w）H_2O_2（终浓度 30mmol/L）

√Tris/BSA 溶液加至 200ml

新鲜配制

终止液（单元 3.9）

1.0mol/L 的山梨醇

√20mmol/L 的 NaN_3

20mmol/L 的 NaF

临用前配制，并冷至 4℃

终止液中有两种毒性物质（NaN_3和 NaF），操作时要小心。并不是所有的研究都适合用 NaN_3和 NaF（如分离细胞器进行功能研究）。

终止液Ⅰ（单元 3.6）

10g 三氯乙酸

50ml 乙酸乙酯

50ml 乙醇

室温可储存 1 个月

终止液Ⅱ（单元 3.6）

在 50ml 水中加入：

1.87g 甘氨酸（终浓度 0.25mol/L）

25ml 1.0mol/L NaOH（终浓度 0.25mol/L）

调整 pH 至 10.0（如有必要）

加水至 100ml

4℃可储存 1～2 天

底物混合物（单元 3.2）

1.0ml 10%（w/v）皂角苷（终浓度 0.5%）

0.92g 对硝基苯酚磷酸盐 diTris 盐（终浓度 100mmol/L）

加水至 20ml

−20℃可储存 1 年

底物溶液（单元 3.6）

90mg 对硝基苯-β-D-半乳吡喃糖苷（终浓度 6mmol/L）

0.25g Triton X-100（终浓度 0.5% w/v）

√柠檬酸盐/磷酸盐缓冲液加至 50ml

4℃可储存 1～2 天

底物溶液Ⅰ（单元 3.4）

在 100ml 水中加入：

0.59g 对硝基苯磷酸盐 · $6H_2O$

−20℃可储存 3 个月

底物溶液Ⅱ（单元 3.4）

在 100ml 水中加入：

56.8g 4-甲基伞形酮（methylumbelliferyl）-*N*-乙酰基 β-D-氨基葡萄糖苷（终浓度 1.5mmol/L）

新鲜配制

蔗糖，1mol/L（单元 3.7）

34.2g 蔗糖（终浓度 1mol/L）

加水至 100ml

4℃可储存 1～2 天

蔗糖缓冲液，pH7.4（SB7.4），pH8.5（SB8.5）（单元 3.8）

蔗糖缓冲液，pH8.5（SB8.5）

在 100ml 水中加入：

20.5g 蔗糖（终浓度 0.3mol/L）

√20μl 1mol/L $MgCl_2$（终浓度 0.1mmol/L）

78mg 2-巯基乙醇（终浓度 5mmol/L）

0.37g 三乙醇胺（终浓度 10mmol/L）

用 HCl 调整至 pH8.5

加水至 200ml

4℃储存 2～3 天

蔗糖缓冲液，pH7.4（SB7.4）

配制过程如 SB8.5，只是调整 pH 为 7.4

蔗糖垫层（仅用于连续梯度）（3.6 单元）

67g 蔗糖（终浓度 67% w/w）

√33ml 10mmol/L Tris・Cl，pH7.4

4℃可储存 1～2 天

蔗糖密度筛，1.2mol/L（单元 3.3）

在 50ml 水中加入：

41.0g 蔗糖（终浓度 1.2mol/L）

0.61g Tris 碱（终浓度 50mmol/L）

0.58g 马来酸（终浓度 50mmol/L）

用 50mmol/L Tris 或 50mmol/L 马来酸调 pH 至 6.4

加水至 100ml

4℃可储存 1～2 天

蔗糖密度筛，(SDB)（单元 3.8）

在 95ml 水中加入：

157g 蔗糖（终浓度 2.3mol/L）

0.37g KCl（终浓度 25mmol/L）

√1ml 1mol/L $MgCl_2$（终浓度 5mmol/L）

√2ml 1mol/L Tris・Cl（终浓度 10mmol/L）

必要时调整 pH 至 7.4

加水至 200ml

4℃储存 2～3 天

蔗糖梯度缓冲液（单元 3.9）

√50mmol/L 乙酸钾

√20mmol/L HEPES，pH6.8

√2mmol/L EDTA

高压消毒

室温可储存数周

蔗糖梯度溶液（单元 3.3）

2.0mol/L 溶液：

在 45ml 的水中加入：

69g 蔗糖（终浓度 2.0mol/L）

√1ml 1mol/L Tris·Cl，pH7.4（终浓度 10mmol/L）

如果需要，用 1mol/L Tris 或 1mol/L HCl 调至 pH7.4

加水至 100ml

4℃可储存 1～2 天

其他浓度蔗糖的配制：根据需要用 10mmol/L Tris·Cl，pH7.4（见配方）稀释，4℃可储存 1～2 天。

1.33mol/L 蔗糖：按 1.33∶0.67 v/v 稀释；1.2mol/L 蔗糖：按 1.2∶0.8 v/v 稀释；1.1mol/L 蔗糖：按 1.1∶0.9v/v 稀释；0.77mol/L 蔗糖：按 0.77∶1.23 v/v 稀释。

蔗糖梯度溶液（单元 3.6）

用蔗糖储存稀释液（见配方）来稀释 70% w/v 蔗糖储存液，可配成 34%和 64%的蔗糖溶液（连续梯度）；或者 30%、40%、54%的蔗糖溶液（不连续梯度）。

蔗糖梯度溶液，1.2mol/L 和 1.5mol/L，溶于蔗糖梯度缓冲液（单元 3.9）

储存液：用蔗糖梯度缓冲液（见配方）配制 1.516mol/L 和 1.213mol/L 的蔗糖溶液，过滤除菌，室温可保存数周，用前预冷。

工作液：实验当天按照需要量配制 1.5mol/L 和 1.2mol/L 的蔗糖溶液，即在 1.516mol/L 和 1.213mol/L 的蔗糖溶液中加入 1mol/L 的 DTT 和 100mmol/L 的 PMSF 使终浓度均达到 1mmol/L。（即 3ml 1.5mol/L 的蔗糖溶液需要加入 3μl 1mol/L 的 DTT 和 30μl 100mmol/L 的 PMSF）。

蔗糖/HEPES 梯度溶液，1.5mol/L 和 1.2mol/L（单元 3.9）

用 HEPES 裂解缓冲液（见配方）配制 1.516mol/L 和 1.213mol/L 的蔗糖储存液，过滤除菌，室温可保存数周，用前预冷。临用前按照需要量配制 1.5mol/L 和 1.2mol/L 的蔗糖溶液，即在 1.516mol/L 和 1.213mol/L 的蔗糖储存液加入 1mol/L 的 DTT 和 100mmol/L 的 PMSF 使终浓度均达到 1mmol/L（即 3ml 1.5mol/L 的蔗糖溶液需要加入 3μl 1mol/L 的 DTT 和 30μl 100mmol/L 的 PMSF）。

蔗糖/咪唑溶液（单元 3.9）

0.4 mol/L 蔗糖/咪唑溶液：0.4mol/L 蔗糖/2mmol/L EDTA/25mmol/L 咪唑·HCl（pH7.0）

1.1 mol/L 蔗糖/咪唑溶液：1.1mol/L 蔗糖/2mmol/L EDTA/25mmol/L 咪唑·HCl（pH7.0）

1.6 5mol/L 蔗糖/咪唑溶液：1.65mol/L 蔗糖/2mmol/L EDTA/25mmol/L 咪唑·HCl（pH7.0）

2.2 5mol/L 蔗糖/咪唑溶液：2.25mol/L 蔗糖/2mmol/L EDTA/25mmol/L 咪唑·HCl（pH7.0）

4℃可储存数周

预冷至 4℃

临用前加蛋白酶抑制剂储存液 C（见配方）

蔗糖/Mg^{2+} 基液（单元 3.5）

在 100ml 水中加入：

√30μl 1mol/L $MgCl_2$（终浓度 0.15mol/L）

17.1g 蔗糖（终浓度 0.25mol/L）

√2ml 1mol/L Tris·Cl（终浓度 10mmol/L）

调整 pH 至 6.7

加水至 200ml

4℃可储存 1～2 天

蔗糖溶液，0.25mol/L（单元 3.2）

12.84g 蔗糖

加水至 150ml

调整 pH 至 7.4，于室温测定密度（折射指数），0.22μm 的硝酸纤维膜过滤除菌，4℃可储存 48h

折射指数＝1.3453±0.0005。溶液也可在－20℃储存 1 年，但用前应检查 pH 和密度。

蔗糖溶液，0.46mol/L（单元 3.2）

7.87g 蔗糖

√0.5ml 1.0mol/L Tris·Cl，pH7.5（终浓度 10mmol/L）

加水至 50ml

调整 pH 至 7.5，于室温测定密度（折射指数），0.22μm 的硝酸纤维膜过滤除菌，4℃可储存 48h

折射指数＝1.3557±0.0005。溶液也可在－20℃储存 1 年，但用前应检查 pH 和密度。

蔗糖溶液，1.42mol/L（单元 3.2）

配制过程如 0.46mol/L 蔗糖溶液（见配方）的配制，但使用 24.3g 蔗糖。

折射指数＝1.4016±0.0005。

蔗糖溶液（80%、30%和 5% w/v）（单元 6.1）

80%（w/v）：用 MES 缓冲盐溶液［25mmol/L 2-（N-吗啉）乙磺酸（MES），pH6.5/150mmol/L NaCl，不含 PMSF 或 Triton X-100］配制 80%（w/v）蔗糖溶液。

30%（w/v）：用 MES-缓冲盐溶液稀释 37.5ml 80%（w/v）蔗糖溶液至 100ml。

5%（w/v）：用 MES-缓冲盐溶液稀释 6.25ml 80%（w/v）蔗糖溶液至 100ml。

每次新鲜配制

蔗糖溶液（90%、35%和 5% w/v）（单元 6.1）

90%（w/v）的蔗糖溶液：用 MES 缓冲盐溶液配制（MES 的终浓度是 10mmol/L，pH6.5，NaCl 的终浓度是 150mmol/L；其余的是水）。由于 90%（w/v）的蔗糖溶液不易溶解，所以通常要加热。首先煮沸一烧杯水，然后将 90%蔗糖混合液置于一无盖的小烧杯或瓶中，放在沸水浴中，搅拌至完全溶解。90%（w/v）的蔗糖溶液室温下可放置 1 年（低温时会有结晶析出），临用前预冷使用量的溶液。

35%（w/v）的蔗糖溶液：用含有 250mmol/L 碳酸钠的 MES 缓冲盐溶液稀释 90%（w/v）的蔗糖溶液至 35%，pH11.0。

5%（w/v）的蔗糖溶液：用含有 250mmol/L 碳酸钠的 MES 缓冲盐溶液稀释 90%（w/v）的蔗糖溶液至 5%，pH11.0。

稀释的蔗糖溶液 4℃条件下可储存 6 个月。

蔗糖储存液稀释液（单元 3.6）

√1.0ml 100mmol/L Na_2EDTA（终浓度 1mmol/L）

√1.0ml 1mol/L Tris·Cl 储存液（终浓度 10mmol/L）

加水至 100ml

加一半水后调整 pH 至 7.4

4℃储存 1～2 天

蔗糖储存液，60%（w/v）（单元 3.8）

60%（w/v）超纯蔗糖

√20mmol/L HEPES/KOH pH6.8

50mmol/L 乙酸钾

√1mmol/L EDTA

√1mmol/L DTT（可选用）

−20℃可储存数月

蔗糖储存液，70%（w/v）（单元 3.6）

70g 蔗糖（终浓度 70% w/v）

√1.0ml 100mmol/L Na_2EDTA（终浓度 1mmol/L）

√1.0ml 1mol/L Tris·Cl 储存液（终浓度 10mmol/L）

加水至 100ml

加入大部分水后调整 pH 至 7.4

4℃储存 1～2 天

蔗糖/琥珀酸溶液（SS）（单元 3.5）

在 1.5L 水中加入：

256.5g 蔗糖（终浓度 0.25mol/L）

0.81g 琥珀酸钠·$6H_2O$（终浓度 1mmol/L）

√6.0ml 100mM Na_2EDTA（终浓度 0.2mmol/L）
√30ml 1mol/L Tris·Cl（终浓度 10mmol/L）
调整 pH 至 7.8
加水至 3L
4℃可储存 1～2 天

补充高葡萄糖的 DMEM-10（单元 13.9）

在含有 4.5g/L 葡萄糖的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基（DMEM）中添加：
√10%（v/v）FBS
50U/ml 青霉素
50μg/ml 链霉素
4℃可储存 1 个月
只有 PC12 细胞需要用热灭活的 FBS。

补充低葡萄糖的 DMEM-10（单元 13.9）

在含有 1g/L 葡萄糖的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基（DMEM）中添加：
√10%（v/v）FBS
5%（v/v）新生小牛血清
50μg/ml 庆大霉素
0.25μg/ml Fungizone（两性霉素 B；Life Technologies）
4℃可储存 1 个月

补充成分（单元 3.6）

0.27g 琥珀酸钠·$6H_2O$（终浓度 10mmol/L）
50mg ADP（钾盐）（终浓度 1mmol/L）
3.8mg DTT（终浓度 0.25mmol/L）

上述任何一种物质或所有物质都可加至 100ml 的匀浆、悬浮或梯度介质中，然后调节 pH。

悬浮缓冲液（SB）（单元 3.3）

在 100ml 水中加入：
17.1g 蔗糖（终浓度 0.25mol/L）
√20ml 100mmol/L HEPES（终浓度 10mmol/L）
用 NaOH 调至 pH7.8
加水至 200ml
4℃可储存 1～2 天

膨胀缓冲液（单元 12.3）

√10mmol/L HEPES 酸，pH7.2
√18mmol/L 乙酸钾
4℃储存 6 个月

3T3-条件培养基（单元 14.2）

培养 3T3 细胞生长至汇合，用新鲜加入 50μg/ml 抗坏血酸的无血清培养基换液，

也可用 DMEM 或 RPMI1640，但是最好用那些已测试过侵袭性细胞可正常生长的培养基。24h 后收集这种条件培养基。

1ml 分装，－20℃可保存 2 年。

TAE（Tris/乙酸/EDTA）电泳缓冲液，10×

24.2g Tris 碱

5.71ml 冰乙酸

3.72g $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$

加水至 1L

TAE，10×（单元 7.5）

48.4g Tris 碱（400mmol/L）

√20ml 0.5M EDTA（10mmol/L）

用冰乙酸调整 pH 至 7.8

体积调整至 1L

室温可储存 1 年

TBE（Tris/硼酸盐/EDTA）电泳缓冲液，10×

108g Tris 碱（890mmol/L）

55g 硼酸（890mmol/L）

960ml 水

√40ml 0.5mol/L EDTA，pH8.0（终浓度 20mmol/L）

TBS（Tris 缓冲盐溶液）

√100mmol/L Tris · Cl，pH7.5

√0.9%（w/v）NaCl

4℃可储存数月

TBS（单元 9.1）

在 800～900ml 水中溶解下列盐：

8g NaCl（终浓度 136.8mmol/L）

0.38g KCl（终浓度 5.0mmol/L）

0.1g Ca_2Cl（无水，终浓度 0.9mmol/L）

0.1g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$（终浓度 0.5mmol/L）

0.1g Na_2HPO_4（无水，终浓度 0.7mmol/L）

√加 25ml 1mol/L Tris · Cl，pH7.4

加水至 1L

50～100ml 分装于玻璃瓶中

高压消毒，室温无限期储存。

TBS，2×(单元 3.2)

2.42g Tris 碱（终浓度 100mmol/L）

3.51g NaCl（终浓度 300mmol/L）

加水至 200ml

用浓 HCl 调整至 pH10.5
4℃无限期储存

TBST（Tris 缓冲盐溶液/Tween 20）（单元 9.2）

√20mmol/L Tris·Cl，pH8.0
√150mmol/L NaCl
0.05%（v/v）Tween 20
4℃储存 3 个月

TC 溶液（单元 13.3）

√1ml 0.1%（w/v）胰岛素溶液（终浓度 0.01%）
√100μl 100mmol/L Ca_2Cl（终浓度 1mmol/L）
√8.9ml HCMF
新鲜配制

TD 缓冲液（单元 12.3）

√138mmol/L NaCl
√5mmol/L KCl
25mmol/L Tris 碱
0.4mmol/L Na_2HPO_4
新鲜配制

TE（Tris/EDTA）缓冲液

√10mmol/L Tris·Cl，pH7.4、7.5 或 8.0（或其他 pH）
√1mmol/L EDTA，pH8.0（见上述配方）

TE 溶液（单元 13.3）

√1ml 0.1%（w/v）胰岛素溶液（终浓度 0.01%）
√10 0μl 100mmol/L EDTA 或乙二醇双（β-乙胺醚）-四乙酸（EGTA；终浓度 1mmol/L）
√8.9ml HCMF
新鲜配制
EDTA 或 EGTA 效果一样。

TEA（三乙醇胺）溶液

50mmol/L 三乙醇胺，pH 约 11.5
√0.1%（v/v）Triton X-100
√0.15mol/L NaCl

TEN（Tris/EDTA/NaCl）溶液

√40mmol/L Tris·Cl，pH7.5
√1mmol/L EDTA，pH8.0
√150mmol/L NaCl

TE/SDS 溶液（单元 3.9）

√10mmol/L Tris·Cl，pH8.0

√1mmol/L EDTA
√0.1%（w/v）SDS
室温可储存数月

硫代硫酸盐溶液（单元 7.6）

20mg $Na_2SO_4 \cdot 5H_2O$ 溶于 100ml 水。
使用前新鲜配制。

胸腺嘧啶脱氧核苷，100mmol/L（单元 11.2）

100mmol/L 胸腺嘧啶脱氧核苷（Sigma）溶于 PBS，pH7.4（见配方），过滤除菌或高压灭菌，－20℃或－80℃储存少于 3 个月。

胸腺嘧啶脱氧核苷-5′-单磷酸-p-邻硝基苯酯（TMP），20mmol/L（单元 3.2）

92mmol/L TMP
加水至 10.0ml
－20℃可储存 1 年

Titanium oxysulfate 硫氧化钛试剂（单元 3.6）

90ml 水中加入 5.56ml 18mol/L 的硫酸（终浓度 1mol/L）。加入 0.225g 的硫氧化钛（终浓度 2.25g/L）。加水至 100ml，新鲜配制。

注意：硫酸和硫氧化钛均有强腐蚀性，纯硫酸加入水中要十分小心，戴上面罩和保护性手套（非一次性的手套，因为遇酸后会融化并贴在皮肤上）。

TM 缓冲液（单元 12.9）

√50mmol/L Tris·Cl，pH7.9
√0.1mol/L KCl（特殊情况下省略）
√12.5mmol/L $MgCl_2$
√1mmol/L EDTA
10%（v/v）甘油
4℃可储存 1 个月
临用前加入：
√1mmol/L DTT
√0.1mmol/L PMSF（亦见附录 2B）
1mmol/L 苯甲脒
1mmol/L 亚硫酸钠

TNE 缓冲液，10×（附录 3D）

100mmol/L Tris 碱
√10mmol/L EDTA
√2.0mol/L NaCl
用浓 HCl 调整 pH 至 7.4
必要时用水稀释至所需浓度

TNET 缓冲液（单元 6.1）

√1%（w/v）Triton X-100

√150mmol/L NaCl

√5mmol/L EDTA

√25mmol/L Tris·Cl，pH8.0

4℃可储存1个月

临用前加入100×蛋白酶抑制剂储存溶液，10μl/ml

TNET-OG缓冲液（单元6.1）

√15（w/v）Triton X-100

√150mmol/L NaCl

√5mmol/L EDTA

√25mmol/L Tris·Cl，pH8.0

60mmol/L N-辛基葡糖苷

4℃可储存1个月

10μl/ml 100×蛋白酶抑制剂储存溶液，用前即加

张力恢复缓冲液（单元8.4）

√10mmol/L Tris·Cl，pH7.6

√0.5mmol/L $MgCl_2$

√0.6mol/L NaCl

4℃可储存1年

使用前立即加入：

10mg/ml 抑蛋白酶酞（Boehringer Mannheim-Roche）

√10mg/ml 亮抑蛋白酶酞（Sigma）

√1mmol/L PMSF（Sigma）

1.8mg/ml 碘乙酰胺（Sigma）

PMSF要在临用前即加，因为在水溶液中有水解作用。

总体积标记（单元6.3）

用合适的溶剂溶解丙酮5mg/ml或叠氮钠10mg/ml。0.22μm滤膜过滤。

水或重氢水（deuterium oxide）也可以使用。

丙酮、叠氮钠可以在214nm检测到吸收峰，丙酮还可以在280nm处检测，水用分光光度法测定无吸收峰，deuterium oxide需要折射率测定仪。

转录缓冲液（TB），5×（单元12.1）

成分	5×储存液的浓度
√2ml 1mol/L Tris·Cl，pH7.5	200mmol/L
√300μl 1mol/L $MgCl_2$	30mmol/L
√500μl 1mol/L NaCl	50mmol/L
√250μl 10mg/ml BSA	250μg/ml
400μl 250mmol/L 精脒	10mmol/L
√6.55ml DEPCW	

用DEPCW配制此配方中所有试剂的储存液，适当高压消毒或过滤除菌，1ml分

装，−20℃可储存1年。

转录终止溶液（单元12.9）

√20mmol/L EDTA，pH8.0

√0.2mol/L NaCl

√1%（w/v）SDS

0.25μg/μl 糖原

室温可储存1个月

转录/翻译（TX/TL）缓冲液，25×（单元12.1）

成分	25×储存液的浓度
√1.4ml 1mol/L HEPES·KOH，pH7.2	140mmol/L
√400μl 1mol/L $MgCl_2$	40mmol/L
200μl 250mmol/L 精脒	5mmol/L
√8ml 12.5mmol/L 4NTP 混合物	10mmol/L（每种）

用DEPCW配制此配方中所有试剂的储存液，高压消毒或过滤除菌，1ml分装储存于−20℃。

转膜缓冲液（单元7.7）

4L水中加入18.2g Tris碱和86.4g甘氨酸，再加入1200ml的甲醇，用水补至6L。此溶液的pH约为8.3～8.4。过滤若用PVDF滤器则甲醇的浓度应当降到15%，若用尼龙滤网，就不能用甲醇。

也可以用CAPS转膜缓冲液。2.21g环己氨基丙烷磺酸（CAPS；游离酸）、0.5g DTT、150ml甲醇，加水至1L。用NaOH调节至pH10.5，冷至4℃。蛋白质分子质量>60kDa时，要降低甲醇浓度至1%（Moos 1992）。

转运缓冲液（单元12.3）

√20mmol/L HEPES酸，pH7.4

250mmol/L 山梨醇

√70mmol/L 乙酸钾

1mmol/L 乙酸镁

−20℃可储存6个月

转运缓冲液（TB）（单元12.4）

将下列溶液混合配制10×储存液

√200ml 1mol/L HEPES，pH7.3（用KOH调整pH）

√275ml 4mol/L 乙酸钾，pH7.3

20ml 0.1mol/L 乙酸镁

√3.8g EGTA

加水至900ml，用KOH或乙酸调至pH7.3

加水至1L

0.2μm 滤膜过滤除菌

4℃可保存数月。

使用当天配制1×的工作液：

用水稀释10×储存液至1×工作液（工作浓度），加1mol/L DTT储存液至终浓度为2mmol/L（储存液分装冻存于−20℃）。

1×TB中含有20mmol/L的HEPES，pH7.3、110mmol/L的乙酸钾、2mmol/L的乙酸镁、2mmol/L的DTT和1mmol/L的EDTA。

Tricaine，0.1%（w/v）（单元12.5）

1g 3-氨基苯甲酸乙酯（Tricaine；Sigma）溶于1L水，新鲜配制。

三氯乙酸（TCA），5%和10%（w/v）（单元12.1）

称量装有TCA的瓶子，记录总重量。戴上橡胶手套、护目镜和塑料围裙，加水后摇晃密闭的瓶子使之溶解，将溶液倒入量筒中，记录空瓶子的重量，算出TCA的量，调整体积至获得10% TCA溶液。取等体积的水稀释一部分溶液而获得5%的溶液。将两种溶液都储存于塑料棕色瓶中。

该方法可以有效防止TCA结晶的烧伤。

三氯乙酸（TCA）溶液，10%（w/v）（单元8.1）

配制100%（w/v）TCA储存液：将一瓶新开的TCA瓶中所有组分溶解于水（例如，500g的TCA加适量水，得到终体积500ml的溶液），4℃可储存1年。通过稀释储存液来配制10%（w/v）TCA溶液，4℃可储存3个月。

注意：TCA有很强的腐蚀性，在配制和处理TCA溶液时要保护眼睛，避免接触到皮肤。

三羟甲基甘氨酸样品缓冲液，2×（单元7.1）

2ml 4×Tris·Cl/SDS，pH6.8（表7.1.1；终浓度0.1mol/L）

2.4ml（3.0g）甘油（终浓度24% v/v）

0.8g SDS（终浓度8% w/v）

0.31g DTT（终浓度0.2mol/L）

2mg考马斯蓝G-250（终浓度0.02% w/v）

加H_2O至10ml，混匀

Tris/BSA溶液（单元3.6）

在100ml水中加入：

0.2g牛血清白蛋白（终浓度1g/L）

√4.0ml 1.0mol/L Tris·Cl（终浓度20mmol/L）

调节pH至7.0

加H_2O至200ml

新鲜制备

Tris缓冲盐溶液，见TBS

Tris·Cl，1mol/L

121g Tris碱溶解于800ml水中

用浓HCl调节pH至期望值

用水定容至 1L

必要时过滤除菌

4℃或室温可储存 6 个月。

要达到 pH7.4，大约需要 70ml HCl，要达到 pH8.0，大约需要 42ml HCl。

要获得所需 pH 为 0.1mol/L 溶液，可以根据表 A.1.6，将一定量的 0.1mol/L HCl 与 100ml 的 0.1mol/L Tris 碱混合。

表 A.1.6 Tris·Cl［三羟甲基氨基甲烷氯化物］，1mol/L[a]

pH，25℃	0.1mol/L HCl/ml	pH，25℃	0.1mol/L HCl/ml	pH，25℃	0.1mol/L HCl/ml
7.2	89.4	7.8	69.0	8.4	34.4
7.3	86.8	7.9	64.0	8.5	29.4
7.4	84.0	8.0	58.4	8.6	24.8
7.5	80.6	8.1	52.4	8.7	20.6
7.6	77.0	8.2	45.8	8.8	17.0
7.7	73.2	8.3	39.8	8.9	14.0

a. Tris 缓冲液的 pH 随温度改变而有明显变化，每℃大约减少 0.028 个 pH 单位。缓冲液的 pH 应当在工作温度下调整到所需的 pH。由于 Tris 的 pK_a 是 8.08，所以当 Tris 的 pH 低于 7.2 或高于 9.0 时，不应当再作缓冲液使用。

Tris·Cl 标准缓冲液，pH7.4（单元 13.12）

√50mmol/L Tris·Cl，pH7.4

√0.2mol/L NaCl

√5mmol/L $CaCl_2$

4℃可保存 1 年

Tris 凝胶缓冲液，4×(200mmol/L Tris·Cl，pH7.1～8.9)（单元 7.2）

24.23g Tris 碱

加水至 500ml

用 1mol/L HCl 调 pH 至 7.1～8.9

加水至 1000ml

4℃可保存 1 个月

Tris/甘油，样品缓冲液，2×(单元 7.2)

√25ml 0.5mol/L Tris·Cl，pH6.8

20ml 甘油

1mg 溴酚蓝

加水至 100ml，混匀

1ml 分装，－70℃可保存 6 个月

Tris/甘氨酸电泳缓冲液（单元 7.2）

15.1g Tris 碱

72.0g 甘氨酸

加水至 5000ml

4℃可保存 1 个月

Tris/NaCl/EDTA 缓冲液（单元 6.1）

√10mmol/L Tris·Cl，pH7.4

√150mmol/L NaCl

√1mmol/L EDTA

4℃可保存 1 个月

临用前加入 100×蛋白酶抑制剂储存液，10μl/ml

Tris/SDS 缓冲液（单元 7.3）

0.3g SDS

0.6g Tris 碱

用 HCl 调至 pH8.0

加水至 100ml

5ml 分装

储存于−80℃（至少可稳定 1 年）

最终浓度为 0.3%（w/v）SDS 及 50mmol/L Tris·Cl，pH8.0。

Tris·SO_4，100mmol/L，pH9.4（单元 3.9）

12.11g Tris 溶于水，用硫酸（H_2SO_4）调 pH 至 9.4，加水使溶液终体积为 1L。高压或过滤除菌。室温可保存数月。

Tris/钠/镁去污剂（TSM）（单元 11.3）

√0.5g Triton X-100（终浓度 0.5% v/v）

√2ml 1mol/L Tris·Cl，pH7.4（终浓度 20mmol/L）

√1ml 5mol/L NaCl（终浓度 50mmol/L）

√0.3ml 1mol/L $MgCl_2$（终浓度 3mmol/L）

96.2ml 双蒸水

0.45μm 的滤器过滤除菌

室温可保存 6 个月

Triton 稀释缓冲液，2.5%（v/v）（单元 10.4）

√12.5ml 4mol/L NaCl（终浓度 100mmol/L）

50ml 1mol/L TEA·Cl，pH8.6（终浓度 100mmol/L）

√5ml 0.5mol/L EDTA，pH8.0（终浓度 5mmol/L）

5.0ml Trasylol（终浓度 1% v/v）

√1.0ml 10% NaN_3（终浓度 0.02% w/v）

加水至 436ml

√加入 62.5ml 20% Triton X-100（终浓度 2.5% v/v）

总体积 500ml

4℃可保存 6 个月

Triton/NH_4OH 细胞裂解缓冲液（单元 13.9）

√PBS 溶液中加入：

√0.5%（v/v）Triton X-100

20mmol/L NH_4OH

4℃可保存 3 个月

Triton X-100，10%（w/v）

1g Triton X-100

加水至 10ml

搅拌溶解

0.45μm 的滤器过滤除菌

室温避光保存，期限 6 个月

Triton X-100 裂解缓冲液（单元 8.4）

√150mmol/L NaCl

√50mmol/L Tris·Cl，pH7.6

√0.5%（v/v）Triton X-100

4℃可保存 1 年

临用前加入：

10mg/ml 抑蛋白酶肽（Boehringer Mannheim-Roche）

√10mg/ml 亮抑蛋白酶肽（Sigma）

√1mmol/L PMSF（Sigma）

1.8mg/ml 碘乙酰胺（Sigma）

由于 PMSF 在水溶液中容易水解，因此必须用前即加。

Triton X-100 溶液，20%（w/v）（单元 7.3）

3g Triton X-100

12ml H_2O

37℃水浴使 Triton X-100 充分溶解

4℃保存（可稳定保存约 2 周）

胰酶，0.5×（单元 11.2）

用 50ml 1×HBSS（见配方）1∶1 稀释 1×胰酶（Life Technologies），加入 1.25ml 0.5mol/L 的 Na_2EDTA（见配方）和 1ml 0.5mol/L 的 HEPES，pH7.2（见配方）。−20℃保存小于 3 个月或 4℃保存小于 1 周。

胰酶/EDTA 溶液（单元 1.1）

用无菌的 HBSS 或 0.9%（w/v）的 NaCl 溶液配制：

√0.25%（w/v）胰酶

√0.2%（w/v）EDTA

−20℃保存≤1 年（至使用时）

胰酶/EDTA 溶液（单元 2.1）

用 PBS 溶液（见配方）配制下列储存液：

0.3%（w/v）胰酶（提取自牛胰腺，Sigma）

√1%（w/v）EDTA 四钠盐

储存液−20℃保存，可保存 3 个月

将97.5ml 0.3%胰酶/PBS溶液和2.5ml 1% EDTA/PBS溶液混合，配制成胰酶/EDTA溶液。4℃可保存1周。

胰酶/EDTA溶液（单元13.9和13.10）

2.5g 胰酶
0.2g EDTA
8g NaCl
0.4g KCl
1g 葡萄糖
0.35g $NaHCO_3$
0.01g 酚红
加水至1L
用0.2μm的滤器过滤除菌
−20℃可保存3个月
该溶液也可以从Life Technologies公司购买。

胰酶溶液，0.1%（w/v）（单元13.3）

10mg 结晶胰酶（Sigma）
√加HCMF至10ml
1ml 分装
−20℃保存小于1个月

TSD还原缓冲液（单元3.9）

√0.1mol/L Tris硫酸盐，pH9.4
√临用前加入10mmol/L DTT

TTBS（Tween 20/TBS）

将聚氧乙烯山梨醇单月桂酸酯（Tween 20）按0.1%溶解于TBS溶液（见配方）。4℃可保存数月。

尿素，8mol/L（单元7.3）

0.75g 超纯尿素
1.0ml H_2O
临用前配制
避免在高于室温的环境中存放。

尿素，8mol/L（单元11.5）

将1920g尿素逐渐溶于2L水中，边加边搅拌。加水至4L，4层棉布过滤。分装成500ml，室温可保存2个月。使用前，用AG 501X-8D混床树脂（Bio-Rad）进行去离子处理。

8mol/L尿素磷酸/盐/EDTA溶液（单元13.7）

480g 超纯尿素
7.6g 氯化钠
√20ml 0.5mol/L 磷酸钠，pH7.7
√25ml 0.2mol/L EDTA，pH7.0

加去离子水至1000ml

该溶液的储存期限<1天

8mol/L 尿素/2mol/L NaCl 溶于磷酸钠/盐水/EDTA（单元13.7）

60g 超纯尿素

14.7g NaCl

√2.5ml 0.5mol/L 磷酸钠，pH7.7

√3.2ml 0.2mol/L EDTA，pH7.0

去离子水加至125ml

该溶液的储存期限<1天。

8mol/L 尿素/0.3mol/L NaCl 溶于磷酸钠/盐水/EDTA（单元13.7）

96g 超纯的尿素

3.5g NaCl

√4ml 0.5mol/L 磷酸钠，pH7.7

√5ml 0.2mol/L EDTA，pH7.0

去离子水加至200ml

该溶液的储存期限<1天。

尿嘧啶-5′-二磷酸［6-^{3}H］半乳糖（UDP-gal）溶液（单元3.3）

5ml 水中加入：

76mg 尿嘧啶-5′-二磷酸半乳糖，二钠盐（终浓度12.5mmol/L）

10μl 尿嘧啶-5′-二磷酸［6-^{3}H］半乳糖（70kBq/ml）

加水至10ml

−80℃可存放1个月

空白体积（V_0）标记（单元6.3）

用合适的溶剂溶解蓝色的葡聚糖（平均分子质量2 000 000），终浓度为1mg/ml。0.22μm 滤膜过滤，4℃保存1周。

蓝色的葡聚糖可被一些支撑物吸收，如 TSK G3000SW。已报道牛胸腺 DNA 可作为一种大孔径支撑物。

洗涤缓冲液（单元8.5）

√0.1%（w/v）Triton X-100

√50mmol/L Tris·Cl，pH7.4

√300mmol/L NaCl

√5mmol/L EDTA

0.02%（w/v）叠氮钠

4℃可存放6个月

洗涤缓冲液（单元13.4）

√150mmol/L NaCl

√25mmol/L Tris·Cl，pH7.4

√1mmol/L $CaCl_2$（加入1mol/L 储存液）

√1mmol/L $MgCl_2$（加入 1mol/L 储存液）

√0.1%（w/v）Triton X-100（Sigma，超纯级）

4℃可存放一个月

可以用 Tris 盐［25mmol/L Tris・Cl（pH7.4）/150mmol/L NaCl］以及 1mol/L $CaCl_2$、1mol/L $MgCl_2$储存液来配制。

小麦胚芽抽提缓冲液的配制（单元 12.1）

成分	终浓度
√5ml 1mol/L 乙酸钾	0.1mol/L
100μl 1mol/L 乙酸镁	2mmol/L
√1ml 1mol/L HEPES-KOH，pH7.2	20mmol/L
8μl 250mmol/L 精脒	40μmol/L
√35.9ml DEPCW	

按照此配方用 DEPCW 配制这些试剂的储存液，用合适的方法高压消毒或过滤除菌。临用前新鲜配制缓冲液，加入 200μl 250mmol/L 的 DTT 储存液（终浓度 1mmol/L，见配方）。

小麦胚芽培养基（WGM）（单元 3.8）

在 100ml 水中加入：

27.4g 蔗糖（终浓度 0.4mol/L）

0.37g KCl（终浓度 25mmol/L）

√1ml 1mol/L $MgCl_2$（终浓度 5mmol/L）

0.39g 2-(N-吗啉）乙磺酸（MES；终浓度 10mmol/L）

用 NaOH 调至 pH6.2

加水至 200ml

4℃保存 2～3 天

XB 缓冲液（单元 12.5 和 12.6）

50mmol/L 蔗糖

√100mmol/L KCl

√0.1mmol/L $CaCl_2$

√1mmol/L $MgCl_2$

√10mmol/L HEPES 钾盐，pH7.7

新鲜制备

XB 盐，20×（单元 12.7）

74.6g KCl（终浓度 2mol/L）

2.04ml 4.9mol/L $MgCl_2$（Sigma；终浓度 20mmol/L）

147mg $CaCl_2$（终浓度 2mmol/L）

加水至 500ml

过滤除菌

4℃可保存 1 年

酵母高密度稀释剂（YHD）（单元 3.7）

在 100ml 水中加入：

8.55g 蔗糖（终浓度 0.125mol/L）

15mg KCl（终浓度 1mmol/L）

√2ml 100mmol/L Na_2EDTA（终浓度 1mmol/L）

√10ml 100mmol/L MES（终浓度 5mmol/L）

0.2ml 乙醇（终浓度 0.1% v/v）

1mol/L NaOH 调至 pH6.0

加水至 200ml

4℃可保存 1～2 天

酵母匀浆基液（YHM）（单元 3.7）

在 100ml 水中加入：

21.9g 山梨醇（终浓度 0.6mol/L）

15mg KCl（终浓度 1mmol/L）

√2ml 100mmol/L Na_2EDTA（终浓度 1mmol/L）

√10ml 100mmol/L MES（终浓度 5mmol/L）

0.2ml 乙醇（终浓度 0.1% v/v）

用 1mol/L NaOH 调至 pH6.0

加水至 200ml

4℃可保存 1～2 天

酵母低密度稀释液（YLD）（单元 3.7）

在 100ml 水中加入：

17.1g 蔗糖（终浓度 0.25mol/L）

15mg KCl（终浓度 1mmol/L）

√2ml 100mmol/L Na_2EDTA（终浓度 1mmol/L）

√10ml 100mmol/L MES（终浓度 5mmol/L）

0.2ml 乙醇（终浓度 0.1% v/v）

用 1mol/L NaOH 调至 pH6.0

加水至 200ml

4℃可保存 1～2 天

酵母山梨醇缓冲液（单元 3.5）

100ml 水中加入：

43.7g 山梨醇（终浓度 1.2mol/L）

40ml 100mmol/L KH_2PO_4（终浓度 20mmol/L）

用 KOH 调至 pH7.4

加水至 200ml

4℃可保存 1～2 天

（王莎丽 译　陈实平 校）

附录 2 实用信息和数据

2A 实用测量值和数据

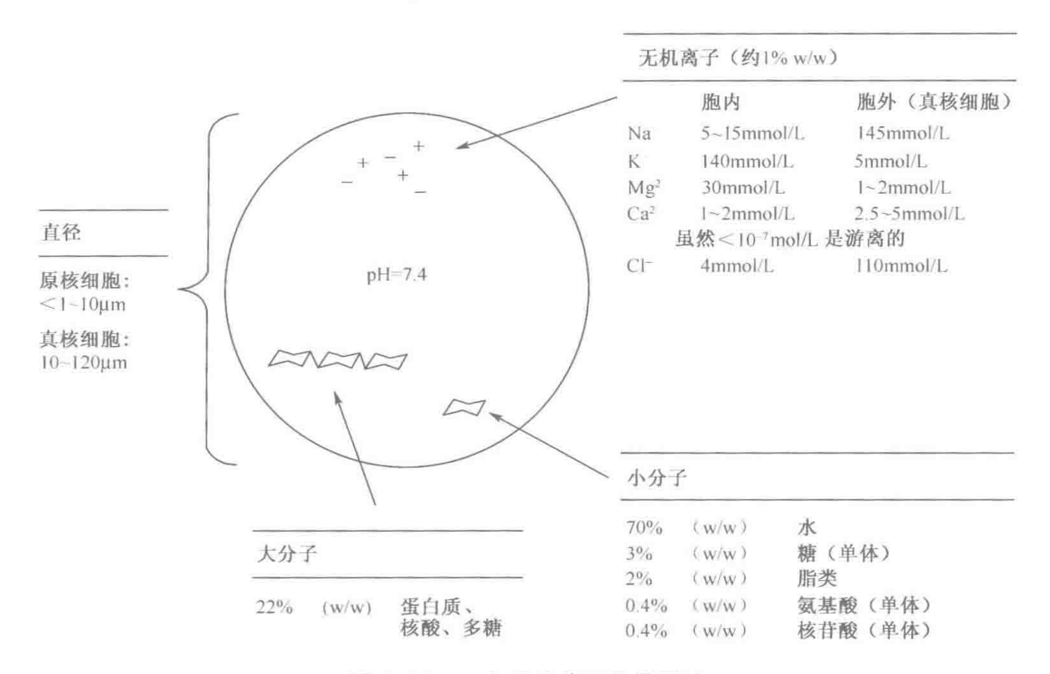


图 A.2A.1 细胞的物理化学图示

图中数据来自于 *The Molecular Biology of the Cell*（Alberts et al. 1994），代表细胞内各种成分的大致浓度。

表 A.2A.1 转换因子

DNA 碱基对分子质量(平均)：649Da	1kb DNA：编码容量 333 个氨基酸
氨基酸分子质量(平均)：110Da	≈36 000Da
1μg/ml DNA：3.08μmol/L 磷酸根	6.5×10⁵Da 双链 DNA(钠盐)
1μg/ml 1kb DNA：3.08 nmol/L 5′端	3.3×10⁵Da 单链 DNA(钠盐)
1 A_{260} 双链 DNA：50μg/ml	10kDa 蛋白质≈91 个氨基酸
1 A_{260} 单链 DNA：37μg/ml	≈273 个核苷酸

表 A.2A.2 肝细胞中主要的细胞内成分的相对体积[a]

细胞内成分	占全部细胞体积的百分比	占每个细胞的百分数(大约)
胞浆	54	1
内体	1	200
溶酶体	1	300
线粒体	22	1700
细胞核	6	1
过氧化物酶体	1	400
粗面内质网	9	1
滑面内质网囊泡＋高尔基囊泡	6	1

a. 数据来源于 *Molecular Biology of the Cell*（Alberts et al. 1994）.

表 A.2A.3　细胞膜中大致的脂类成分[a]

脂质	占总体脂质的百分比(按照重量)					
	肝细胞膜	红细胞膜	髓磷脂	线粒体(内膜+外膜)	内质网	大肠杆菌
胆固醇	17	23	22	3	6	0
糖脂类	7	3	28	极少量	极少量	0
卵磷脂	24	17	10	39	40	0
磷脂酰乙醇胺	7	18	15	35	17	70
磷脂酰丝氨酸	4	7	9	2	5	极少量
鞘磷脂	19	18	8	0	5	0
其他	22	13	8	21	27	30

a. 数据来源于 *Molecular Biology of the Cell*(Alberts et al. 1994).

表 A.2A.4　二十种常见的氨基酸

氨基酸	三字码	一字码	分子质量/(g/mol)
丙氨酸	Ala	A	89.1
精氨酸	Arg	R	174.2
天冬酰胺	Asn	N	132.1
天冬氨酸	Asp	D	133.1
半胱氨酸	Cys	C	121.2
谷氨酸	Glu	E	147.1
谷氨酰胺	Gln	Q	146.2
甘氨酸	Gly	G	75.1
组氨酸	His	H	155.2
异亮氨酸	Ile	I	131.2
亮氨酸	Leu	L	131.2
赖氨酸	Lys	K	146.2
甲硫氨酸	Met	M	149.2
苯丙氨酸	Phe	F	165.2
脯氨酸	Pro	P	115.1
丝氨酸	Ser	S	105.1
苏氨酸	Thr	T	119.1
色氨酸	Trp	W	204.2
酪氨酸	Tyr	Y	181.2
缬氨酸	Val	V	117.1

参考文献：Alberts et al. 1994

2B　细胞生物学研究中常用的药物概要

下面附录按照字母顺序列出了研究各种细胞生物学过程的常用药物。表 A.2B.1 列

出的药物是按活性排列的。除了作标记的外，所列大部分药物都具有细胞通透性。然而，尽管下列许多药物在体外的选择性已被详细阐述，但由于其细胞通透性未知，其对细胞内靶点的相应效应不能直接根据其细胞外浓度精确确定。因此，对于任一特定药物，应该选用几种不同浓度及不同方法来确定其选择性。

尽管未特别指出，下列许多药物都具有危险性，应十分小心处理。材料安全数据表（material safety data sheets，MSDS）通常提供了危险品或有毒药品。有时这些药品为新产品而尚未进行毒性测试。因此，为确保安全，处理所有药品时都应该小心。

表 A. 2B. 1　细胞生物学研究中常用药物的生物活性

功　能	药　物
DNA 复制抑制剂	蚜肠霉素（Aphidicolin）
	阿糖胞苷（Ara-C）
	喜树碱（Camptothecin）
	依托泊苷（Etoposide）
	羟基脲（Hydroxyurea）
	L-含羞草碱（L-Mimosine）
影响细胞骨架的药物	秋水仙胺（Colcemid）
	秋水仙碱（Colchicine）
	细胞松弛素 B（Cytochalasin B）
	细胞松弛素 D（Cytochalasin D）
	Latrunculins*
	诺考达唑（Nocodazole）
	紫杉醇（Taxol）
	长春花碱（Vinblastine）
影响细胞内 Ca^{2+} 的药物	A23187
	BAPTA
	离子霉素（Ionomycin）
	衣霉素（Thapsigargin）
影响寡糖生物合成/处理的药物	栗树精胺（Castanospermine）
	脱氧甘露尻霉素（Deoxymannojirimycin）
	脱氧野尻霉素（Deoxynojirimycin）
	衣霉素（Tunicamycin）

* 一种肌动蛋白抑制酶，建议译为肌动蛋白抑酶——译者注。

续表

功　能	药　物
影响细胞器 pH 的药物	氯化铵(Ammonium chloride)
	巴佛洛霉素 A_1(Bafilomycin A_1)
	CCCP
	氯喹(Chloroquine)
	刀豆菌素 B (Concanamycin B)
	孟宁素(Monensin)
	尼日利亚菌素(Nigericin)
增加细胞内 cAMP 水平的药物	8-溴-cAMP(8-Bromo-cyclic AMP)
	霍乱毒素(Cholera toxin)
	双丁酰环磷腺苷(Dibutyryl-cAMP)
	毛喉素(Forskolin)
激酶抑制剂	双吲哚马来酰亚胺Ⅰ(Bisindolylmaleimide Ⅰ,GF109203 X)
	钙蛋白酶抑制蛋白 C(Calphostin C)
	氯化白屈菜季铵碱(Chelerythrine chloride)
	染料木素(Genistein)
	H-7
	除莠霉素 A(Herbimycin A)
	KN-62
	LY294002
	ML-7
	Olomoucine
	PD 98059
	Piceatannol
	星形孢菌素(Staurosporine)
	Tyrphostins*
	渥曼青霉素(Wortmannin)
磷酸酶抑制剂	花萼海绵诱癌素(Calyculin A)
	微囊藻毒素 LR (Microcystin-LR)
	岗田酸(Okadaic acid)
	氧化苯胂(Phenylarsine oxide)
	原钒酸钠(Sodium orthovanadate)

* 一种酪氨酸磷酸化抑制剂

续表

功 能	药 物
蛋白酶抑制剂	钙蛋白酶抑制剂Ⅰ(Calpain inhibitor Ⅰ)
	E-64
	Lactacystin
	亮抑肽酶(Leupeptin)
	MG-132
	PMSF
	抑肽素 A(Pepstatin A)
蛋白质合成抑制剂	茴香霉素(Anisomycin)
	放线菌酮 (Cycloheximide)
	依米丁(Emetine)
	潮霉素(Hygromycin)
	嘌呤霉素(Puromycin)
转录抑制剂	放射菌素 D (Actinomycin D)
	毒伞肽(α-Amanitin)
其他复合物	布雷菲尔德菌素 A(Brefeldin A)
	环孢霉素 A (Cyclosporin A)
	去铁胺(Desferrioxamine)
	2-脱氧葡萄糖(2-Deoxyglucose)
	二硫代苏糖醇(Dithiothreitol, DTT)
	非律平(Filipin)
	伏马镰孢毒素 B_1(Fumonisin B_1)
	新霉素(Geneticin,G418)
	细霉素 B(Leptomycin B)
	洛伐他汀(Lovastatin)
	溶血磷脂酸(Lysophosphatidic acid)
	蜂毒肽(Mastoparan)
	乌本苷(Ouabain)
	PDMP
	百日咳毒素(Pertussis toxin)
	佛波酯(Phorbol esters)
	雷帕霉素 (Rapamycin)
	叠氮钠(Sodium azide)
	丁酸钠(Sodium butyrate)
	三氟拉嗪(Trifluoperazine)
	缬氨霉素(Valinomycin)
	W-7

细胞生物学中常用的药物

A23187

钙离子载体；与二价阳离子形成稳定复合物，可以增加其穿透生物膜的能力。是增加细胞内钙离子浓度的有效工具。A23187 的效应依赖胞外钙的存在。可作为荧光探针用于研究蛋白质的疏水性。4-溴-A23187 为其非荧光衍生物。

溶于：DMSO、甲醇

储存浓度：100mmol/L（4℃，避光储存）

工作浓度：0.1～20μmol/L

孵育时间：2min～24h

在水中一段时间后聚集。

放射菌素 D（Actimomycin D）

通过与 DNA 中的脱氧鸟苷结合以及抑制 RNA 聚合酶而抑制转录。可诱导多个细胞系凋亡。但在 PC12 细胞中，放线菌素 D 可抑制由拓扑异构酶Ⅱ抑制剂依托泊苷诱导的细胞程序性死亡。

溶于：甲醇

储存浓度：100mmol/L（4℃）

工作浓度：1～5μmol/L

孵育时间：5min～24h

α-鹅膏蕈碱（α-Amanitin）

通过优先与 RNA 聚合酶Ⅱ结合从而有效、特异地抑制 mRNA 的合成。高浓度时还可抑制 RNA 聚合酶Ⅲ。

溶于：甲醇、水

储存浓度：2～10 mg/ml（4℃，避光储存）

工作浓度：1～10μg/ml（抑制 RNA 聚合酶Ⅱ）至 200μg/ml（抑制 RNA 聚合酶Ⅲ）

孵育时间：15～60min

氯化铵（Ammonium chloride，NH_4Cl）

弱碱性。用于中和酸性内膜成分。抑制神经鞘氨基的合成。

溶于：水（完全可溶）

储存浓度：5mol/L（4℃储存）

工作浓度：1～50mmol/L

孵育时间：15s 内有效

茴香霉素（Anisomycin）

通过阻断翻译过程中的肽酰转移酶而抑制蛋白质合成。激活 p54（JNK2）和 MAP 激酶。可能是研究引起核信号及诱导 *c*-fos 和 *c*-jun 表达的胞浆信号的有用工具。已知可诱导 U937 细胞凋亡。

溶于：DMSO

储存浓度：100μg/ml（4℃储存）

工作浓度：50ng/ml～1μg/ml

孵育时间：根据研究不同，30min～16h 不等

蚜肠霉素（Aphidicolin）

细胞同步化试剂。DNA 聚合酶 α 和 δ 的可逆抑制剂；将细胞阻滞在 S 早期。在白血病细胞系中，加强由阿糖类核苷诱导的细胞凋亡。

溶于：DMSO、甲醇

储存浓度：2mg/ml（4℃储存）

工作浓度：0.5～100μg/ml

孵育时间：12～24h

阿糖胞苷（Ara-C）

抑制 DNA 合成。S 期毒性试剂，其活性代谢产物三磷酸阿糖胞苷（Ara-CTP）为 DNA 聚合酶的底物，可掺入到 DNA 中。抗肿瘤、抗病毒药物，尤其对白血病有效。可诱导人急性髓性白血病细胞及大鼠交感神经元细胞凋亡。

溶于：水

储存浓度：20 mg/ml（4℃储存）

工作浓度：0.1～1μg/ml

孵育时间：>3h

巴佛洛霉素 A1（Bafilomycin A_1）

空泡型 H^+-ATP 酶的有效、特异性抑制剂。可作为区别不同类型 ATP 酶的有效工具。在巨噬细胞中可以抑制溶酶体的运输。

溶于：DMSO

储存浓度：50 μmol/L（－20℃，避光储存）

工作浓度：10～100nmol/L

孵育时间：10min～2h

BAPTA

钙离子螯合剂，与 Ca^{2+} 的亲和力较 Mg^{2+} 大 10^5 倍；可同时调节胞内（使用其膜通透性 AM 酯）及胞外 Ca^{2+} 水平。

溶于：DMSO

储存浓度：1～10mmol/L（分装－20℃储存，避光，避免反复冻融）

工作浓度：（BAPTA-AM）：1～20μmol/L

孵育时间：20～37℃孵育 15～60min

使用 BAPTA 孵育前，先用无血清培养基（血清可能具有酯酶活性）洗涤细胞 2 或 3 次。负载液也应该不含氨基酸或为不含有一级胺或二级胺的缓冲液，这些胺类可以黏着 AM 酯，阻止负载。

双吲哚马来酰亚胺Ⅰ（BisindolylmaleimideⅠ）（GF 109203X）

高选择性的具有细胞通透性的蛋白激酶 C（PKC）抑制剂，其结构与星形孢菌素（staurosporine）相似，但选择性更高。高浓度时可抑制蛋白激酶 A。是 PKC 催化结构域中 ATP 结合位点的竞争性抑制物。由于 ATP 的水平在细胞内通常很高，bisindolylmaleimide Ⅰ在全细胞中的作用力相应减弱。

溶于：DMSO

储存浓度：2mmol/L（≤4℃）

工作浓度：20nmol/L～1μmol/L

孵育时间：15min～6h

水溶性的盐化合物也可用

布雷菲尔德菌素 A（Brefeldin A）

抑制 GTP 与 ARF（ADP 核糖基化因子）家族的几个成员交换核苷。抑制胞质外被体（COPI）复合物与高尔基体膜的结合；诱导高尔基体在内质网内的快速再分布；许多细胞系中抑制从内质网输出。作用可逆。

溶于：甲醇

储存浓度：1～20 mmol/L（−20℃储存）

工作浓度：1～5μmol/L

孵育时间：5min～24h，作用快速（30s）

8-溴-cAMP（8-Bromo-cyclic AMP）

细胞通透性 cAMP 类似物。可激活蛋白激酶 A。与 cAMP 相比，可增加抵抗由细胞磷酸二酯酶引起的降解。

溶于：水

储存浓度：100 mmol/L（−20℃储存）

工作浓度：10～500μmol/L

孵育时间：可达 24h

钙蛋白酶抑制剂Ⅰ（Calpain inhibitor Ⅰ，ALLN）

抑制钙蛋白酶Ⅰ、钙蛋白酶Ⅱ、钙蛋白酶 B 和组织蛋白酶 L。乙醛结合肽；抑制中枢半胱氨酸蛋白酶和蛋白酶体。保护由缺氧或缺血引起的中枢损害。抑制由泛素-蛋白酶体介导的 IkB 的水解。在 CHO 细胞中，通过抑制细胞周期素（cyclin）B 的降解而使细胞周期停滞在 G_1/S 点和中期/后期，由于其分子质量低且缺少电荷而具有膜通透性。

溶于：DMSO、甲醇和二甲基甲酰胺

储存浓度：25 mmol/L（4℃储存）

工作浓度：25～100μmol/L

孵育时间：1～18h

钙蛋白酶抑制蛋白 C（Calphostin C）

蛋白激酶 C（PKC；K_i＝50nmol/L）的有效、高选择性抑制剂。与佛波酯和甘油二酯竞争性结合 PKC 调节结构域。不与 Ca^{2+} 或磷脂竞争。高浓度时可抑制肌球蛋白轻链激酶（K_i＞5μmol/L）、蛋白激酶 A（K_i＞50μmol/L）、蛋白激酶 G（K_i＞25μmol/L）和 $p60^{v\text{-}src}$（K_i＞50μmol/L）。

溶于：DMSO

储存浓度：1 mmol/L（4℃避光储存）

工作浓度：10nmol/L～3μmol/L

孵育时间：15～60min

钙蛋白酶抑制蛋白 C 对 PKC 的抑制需在 PKC 存在时短暂暴露于可见光下。进一步信息详见 *Biomol Catalog and Handbook*，5th ed. 中表 1（激酶抑制剂的选择性）和

Alexis Biochemicals 中的#11 技术注解。

花萼海绵诱癌素（Calyculin A）

细胞通透性抑制剂，对丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 1 和 2A 具有高选择性。花萼海绵诱癌素（Calyculin A）较 PP-1 类磷酸酶抑制剂岗田酸强 20～300 倍。可刺激平滑肌收缩，抑制培养的人角成质细胞蛋白质磷酸化及抑制凋亡。

溶于：DMSO、乙醇

储存浓度：10 μmol/L（－20℃避光，防潮储存）

工作浓度：0.5～50nmol/L

孵育时间：15min～2h

进一步信息详见 Alexis Biochemicals 中的#19 技术注解。可能引起细胞变圆。

喜树碱（Camptothecin）

DNA 拓扑异构酶Ⅰ的可逆性抑制剂。通过结合并稳定拓扑异构酶-DNA 共价复合体而诱导 DNA 合成在复制叉处断开。导致 S 期细胞毒性。具有抗白血病和抗肿瘤特性。抑制 tat 介导的 HIV-1 病毒的反式激活。

溶于：DMSO

储存浓度：1～10mmol/L（4℃储存）

工作浓度：0.1～10μmol/L

孵育时间：文献报道从 15min～24h 不等

栗树精胺（Castanospermine）

α、β 葡萄糖苷酶抑制剂；糖蛋白加工抑制剂。在新合成的糖蛋白中抑制钙联蛋白和钙网蛋白与多糖的 N 端相连。抑制 HIV 感染。

溶于：水

储存浓度：1mmol/L（4℃储存）

工作浓度：1～5μmol/L

孵育时间：15min～3h

CCCP（Carbonyl cyanide-m-chlorophenyl hydrazone）

离子载体。氧化磷酸化解偶联剂，可抑制线粒体功能。裂解膜能力大约为 2，4-二硝基酚的 100 倍。可抑制转运过程，延缓生长。

溶于：DMSO、乙醇

储存浓度：1～10mmol/L（4℃储存）

工作浓度：1～5μmol/L

孵育时间：5～15min

氯化白屈菜赤碱（Chelerythrine chloride）

蛋白激酶 C（K_i＝0.66μmol/L）的有效的、选择性抑制剂，具有细胞通透性。作用于催化结构域。白屈菜赤碱与 PKC 底物竞争作用，但不与 ATP 竞争。因此，细胞内高浓度的 ATP 不会降低整个细胞内白屈菜赤碱的活性，与纯化的酶制剂不同。在血小板中抑制凝血　烷（thromboxane）的形成和磷酸肌醇的代谢。诱导 HL-60 细胞凋亡。

溶于：DMSO

储存浓度：10mmol/L（－20℃）

工作浓度：1μmol/L

孵育时间：15～2h

进一步信息详见 Alexis Biochemicals 中的＃8 技术注解。

氯喹（Chloroquine）

聚集在酸性细胞器中的三胺，可中和其 pH；在吞噬体-内体和吞噬体-溶酶体融合发挥多种效应。抗疟疾药物，在恶性疟原虫（*P. falciparum*）中通过载体介导的途径起作用。可以激活蛋白激酶。

溶于：水

储存浓度：1～10 mg/ml（室温保存）

工作浓度：10～200μg/ml

孵育时间：15min～2h

霍乱毒素（Cholera toxin）

包含一个单独的 A 亚单位（分子质量为 29 kDa）和一个含有 5 个 B 多肽链的 B 亚单位（分子质量为 55kDa）。B 亚单位可与细胞表面的 GM1 神经节苷脂受体结合，促进 A 亚单位穿过细胞膜。A 亚单位催化异三聚 G 蛋白（主要为 G_s）α 亚单位上的精氨酸残基的 ADP-核糖基化，减少其内源性 GTP 酶活性。由于其激活了膜结合的腺苷酸环化酶而具有毒性。随后，细胞内增加的 cAMP 水平导致电解质出胞增多及水丢失。霍乱毒素的最大活性需要 ADP-核糖基化因子（ARF）的存在。

溶于：水

储存浓度：1～10 mg/ml（4℃，禁止冻存）

工作浓度：100ng/ml～2μg/ml

孵育时间：2～24h

秋水仙胺（Colcemid）

细胞同步化试剂。可使微管解聚，抑制微管形成。低浓度时使纺锤体动力性失活。通过阻断有丝分裂而诱导 HeLa S3 细胞凋亡。秋水仙胺为秋水仙碱的衍生物，毒性较弱。

溶于：乙醇

储存浓度：1mmol/L（低于室温储存）

工作浓度：1～10μmol/L

孵育时间：根据不同的研究，1～24h 不等

秋水仙碱（Colchicine）

有丝分裂抑制剂，常用于细胞分裂的研究。破坏微管，抑制微管蛋白聚合。诱导 PC12 细胞和大脑颗粒细胞凋亡。

溶于：乙醇

储存浓度：1mmol/L（低于室温避光储存，防止潮湿）

工作浓度：1～10μmol/L

孵育时间：根据不同的研究，1～24 h 不等

刀豆菌素 B（Concanamycin B）

空泡型 H^+-ATP 酶的高度特异和敏感性抑制剂（K_i＝20pmol/L）。与刀豆菌素 A（多叶霉素 folimycin）相关。比巴佛洛霉素 A_1（Bafilomycin A_1）更有效、更特异。抑制细胞器如溶酶体和高尔基器的酸化。阻断病毒糖蛋白在细胞表面的表达而不影响其合成。

溶于：甲醇、乙醇

储存浓度：10μmol/L（－20℃避光储存）

工作浓度：50nmol/L

孵育时间：5min～1h

放线菌酮（Cycloheximide）

抑制真核细胞蛋白质合成，但对原核细胞没有影响。抑制翻译过程中的转位。诱导多种细胞凋亡。然而，可抑制用毒胡萝卜素（thapsigargin）和离子霉素处理过的大鼠胸腺细胞中 DNA 的切割。

溶于：水、乙醇、甲醇

储存浓度：10mg/ml（低于室温储存）

工作浓度：根据不同的细胞类型，1～100μg/ml 不等

孵育时间：15min 内有效

为达到对蛋白合成 90％以上的抑制，CHO 细胞和 HeLa 细胞仅需加 1～10μg/ml，但 COS 细胞需要加 100μg/ml。

环孢霉素 A（Cyclosporin A，CsA）

具有免疫抑制性的环寡肽。可诱导一些类型的细胞凋亡，而对另外一些细胞则抑制凋亡。环孢霉素 A 和亲环素的混合物在纳摩尔水平可抑制蛋白磷酸酶 2B（钙调神经磷酸酶，Calcineurin）。抑制由 IL-1α、脂多糖和 TNF-α 诱导的一氧化氮合酶。

溶于：乙醇、甲醇

储存浓度：1～5 mmol/L（4℃储存）

工作浓度：0.1～10μmol/L

孵育时间：任何情况下均为 15min～24h

细胞松弛素 B（Cytochalasin B）

为具有细胞通透性的真菌毒素，可阻断收缩性微丝的形成。通过抑制单体加入至聚合体有刺的（快速生长的）一端而缩短肌动蛋白丝。抑制胞浆分裂、细胞运动、吞噬作用、血小板聚集以及葡萄糖转运。

溶于：DMSO、乙醇

储存浓度：10mmol/L（－20℃避光储存）

工作浓度：1～20μmol/L

孵育时间：15min～2h

细胞松弛素 D（Cytochalasin D）

对肌动蛋白丝功能的抑制，比细胞松弛素 B 大约强 10 倍。不抑制细胞中葡萄糖转运。调节 T 淋巴细胞 CD4 的交叉联结，增加细胞内 Ca^{2+} 浓度。具有抗肿瘤活性。

溶于：DMSO

储存浓度：10mmol/L（－20℃避光储存）

工作浓度：1～20μmol/L

孵育时间：15min～2h

2-脱氧葡萄糖（2-Deoxyglucose）

葡萄糖非正常代谢衍生物。与葡萄糖竞争 GLUT-2 转运体；2-脱氧葡萄糖被己糖激酶磷酸化后，可通过糖酵解途径有效地抑制葡萄糖的流动。与叠氮钠或寡霉素联合应用可降低细胞内 ATP 的水平。在 RAW 264.7 细胞中，阻断高糖对 IL-1 释放的抑制。

溶于：水

储存浓度：1mol/L（4℃储存）

工作浓度：5～50mmol/L

孵育时间：15min～3h

脱氧野尻霉素（Deoxymannojirimycin）

竞争性 α 甘露糖苷酶Ⅰ抑制剂，可抑制高甘露糖转变成复杂的寡糖。抑制哺乳动物细胞中高尔基 α-甘露糖酶Ⅰ（一种 α-1,2-甘露糖酶）。对大鼠肝脏中的其他甘露糖酶无显著影响（100mmol/L 的脱氧野尻霉素仅可抑制 α-1,2-特异性内质网甘露糖酶的 2%～5%，而高尔基 α-甘露糖酶Ⅱ可被抑制大约 14%）。

溶于：水

储存浓度：100mmol/L（－20℃储存）

工作浓度：1～5mmol/L

孵育时间：任何情况下均为 30min～24h

脱氧甘露尻霉素（Deoxynojirimycin）

特异性的葡萄糖苷酶抑制剂。抑制内质网修饰的葡萄糖苷酶Ⅰ和Ⅱ，选择性地去除 $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ 多糖生物合成中 N 端连接的三个葡萄糖残基。在内质网中抑制钙联蛋白（calnexin）和钙网蛋白（calreticulin）结合到糖蛋白的 N 端。

溶于：水

储存浓度：100 mmol/L（4℃储存）

工作浓度：1～5mmol/L

孵育时间：任何情况下均为 15 min～24h

1mmol/L 以上的浓度，1-脱氧氮杂-D-葡萄糖可抑制脂联寡糖的生物合成及修饰。这种情况下，N-甲基-脱氧氮杂-D-葡萄糖可能为一种更有效的抑制剂，原因可能为 N-甲基增加了其穿过细胞膜的能力。

去铁胺（Desferrioxamine，DFO）

铁螯合剂。常用于铁离子超负荷疾病中螯合铁离子。可保护多巴胺诱导的细胞死亡。也干扰氢氧游离基（Hydroxy-Radical）的形成。抑制血管平滑肌细胞的增殖。

溶于：DMSO；轻微溶于水

储存浓度：10～50 mmol/L（4℃储存）

工作浓度：10μmol/L～2 mmol/L

孵育时间：最多达 18h

双丁酰基环磷腺苷（Dibutyxyl cyclic AMP）

具有高度膜通透性的 cAMP 类似物，可抵抗磷酸二酯酶的切割。蛋白激酶 A 的组成性激活剂。此药物可由于细胞内外酯酶的作用释放出丁酸盐。丁酸盐具有独立的生物学效应（见丁酸钠）。

溶于：DMSO、乙醇

储存浓度：1mol/L（－20℃储存）

工作浓度：100μmol/L～1 mmol/L

孵育时间：任何情况下均为 1～48h

二硫苏糖醇（1，4-Dithiothreitol DTT；Cleland 试剂）

SH 基团具细胞通透性的保护剂；在还原状态下完全为单硫醇的形式，可降低二硫化物的含量。DTT 可干扰内质网中的蛋白质的折叠以及运出，但不抑制其从中间细胞器至高尔基复合器的转运，作用可逆。

溶于：水、乙醇

储存浓度：1mol/L（4℃储存）

工作浓度：1～10 mmol/L

孵育时间：1min 至数小时

E-64

半胱氨酸蛋白酶（木瓜蛋白酶和组织蛋白酶 B 和 L）的不可逆抑制剂。对其他蛋白质的半胱氨酸残基不起作用。

溶于：水

储存浓度：1mg/ml（－20℃储存）

工作浓度：0.5～10 μg/ml

孵育时间：长达 24h

依米丁（Emetine）

通过抑制核糖体沿 mRNA 的移动而不可逆地阻断蛋白质的合成。可刺激应激活化的蛋白激酶/c-Jun 激酶（SAPK/JNK）通路的快速特异磷酸化。可抑制多种细胞系的凋亡。在原代培养的大鼠肝细胞中，几种蛋白质合成抑制剂的相对抑制活力顺序如下：依米丁＞茴香霉素＞放线菌酮＞嘌呤霉素，其中嘌呤霉素在 1μmol/L 浓度时仅有微弱的抑制作用。实际上，仅依米丁和茴香霉素在 10μmol/L 浓度下，可达到对蛋白质合成 90%～95%的抑制。放线菌酮和嘌呤霉素在相同浓度下，仅分别有 80%和 60%的抑制作用。

溶于：乙醇

储存浓度：10～100mmol/L（4℃避光储存）

工作浓度：10～20 μmol/L

孵育时间：15～30min；可孵育达 24h

依托泊甘（鬼臼乙叉苷，Etoposide，VP-16）

拓扑异构酶Ⅱ抑制剂。稳定拓扑异构酶Ⅱ与 DNA 形成的共价复合物。对多种肿瘤有显著抗性，包括生殖细胞肿瘤、小细胞肺癌和恶性淋巴瘤。可诱导小鼠胸腺细胞和 HL-60 细胞凋亡。可激活 PKCα。

溶于：DMSO

储存浓度：100～500mmol/L（室温储存）

工作浓度：50～200μmol/L

孵育时间：1～24h

菲律宾菌素（Filipin）

胆固醇结合荧光染料。对未酯化的胆固醇有特异性。可从细胞膜表面结合并去除胆固醇。可以可逆性地去除细胞膜的穴样内陷（caveolae）。

溶于：甲醇

储存浓度：500μg/ml（4℃避光储存）

工作浓度：5～50μg/ml

孵育时间：1h

毛喉素（Forskolin）

通过直接与催化亚单位相互结合而激活腺苷酸环化酶。可导致细胞内 cAMP 浓度增高。几种毛喉素的衍生物具有不同特性。可增强布雷菲（尔）德菌素（brefeldinA）的解毒作用。

溶于：DMSO、乙醇

储存浓度：10～100mmol/L（4℃储存）

工作浓度：10μmol/L（增加 cAMP 水平）；100μmol/L 抑制布雷菲（尔）德菌素

孵育时间：根据测定方法的不同，孵育细胞 15min～12h 不等

伏马菌素 B（Fumonisin B_1）

通过抑制神经鞘氨醇 N-转酰基酶（acyltransferase）（神经酰胺合成酶）抑制神经鞘脂类的生物合成。神经元中，神经鞘磷脂的生物合成较鞘糖脂更容易被抑制。抑制由丁酸诱导的细胞相关志贺氏菌毒素向高尔基器和内质网运输的增加。可诱导猴肾细胞凋亡。

溶于：甲醇

储存浓度：10～100mmol/L（4℃储存）

工作浓度：任何时候均为 1～100 μmol/L

孵育时间：根据研究过程的不同，孵育细胞 15min～18h 不等

新霉素（Geneticin，G418）

对细菌、酵母、高等植物、原生动物以及哺乳动物细胞均有氨基苷类毒性。用于真核细胞从转座子 Tn5 和 Tn601 稳定转染新霉素（neo）抗性基因的选择和维持。

溶于：水或培养基

储存浓度：培养基中 2mg/ml（活性 G418），调整 pH7.4 左右（4℃储存）

工作浓度：通常为 50～1000μg/ml（不同的细胞类型必须根据实验确定最佳浓度）

孵育时间：>1 周

在那些具有相对稳定基因组的细胞类型（如 CHO 细胞）中，一旦筛选出稳定的细胞，通常不需继续在新霉素中培养。丁酸钠可增强稳定细胞中病毒启动子的表达下调。

染料木素（Genistein）

通过与 ATP 的竞争性抑制剂相互作用而抑制蛋白质酪氨酸激酶。在 A431 细胞中

抑制 EGF 刺激的酪氨酸磷酸化，也抑制其他培养细胞中的激酶。

溶于：DMSO

储存浓度：100～500mmol/L（－20℃储存）

工作浓度：50～300μmol/L

孵育时间：15min～1h

进一步信息详见 *Biomol Catalog and Handbook*，5 th ed. 中的表Ⅱ（酪氨酸蛋白激酶抑制剂的选择性）。

H-7

广泛存在的、具有细胞通透性的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶抑制剂。可抑制蛋白激酶 C（K_i=6.0μmol/L）、蛋白激酶 A（K_i=3.0μmol/L）、蛋白激酶 G（K_i=5.8μmol/L）和肌球蛋白轻链激酶（K_i=97μmol/L）。诱导 HL-60 细胞凋亡形成 DNA 片段以及细胞死亡。具有不同选择性的多种类似物。

溶于：水

储存浓度：100mmol/L（4℃储存）

工作浓度：10～100μmol/L

孵育时间：15min～3h

进一步信息详见 *Biomol Catalog and Handbook*，5th ed. 中的表Ⅰ（激酶抑制剂的选择性）和 *Alexis Biochemicals* 中的＃10 技术注解。

除莠霉素 A（Herbimycin A）

细胞中一种不可逆的、选择性的具细胞通透性的蛋白酪氨酸激酶抑制剂；可与硫醇基起反应。对 Src、Yes、Fps、Ros、Abl 和 ErbB 癌基因产物有效。可呈剂量依赖性抑制 PDGF 诱导的磷脂酶 D 的激活。

溶于：DMSO

储存浓度：10mmol/L（－20℃避光储存）

工作浓度：1～10μmol/L

孵育时间：15min～1h

羟基脲（Hydroxyurea）

抗肿瘤药。通过抑制核苷酸还原酶阻断 DNA 的合成；使细胞停滞在 G_1/S 间隙。

溶于：水

储存浓度：1mol/L（4℃储存）

工作浓度：50μmol/L～1mmol/L

孵育时间：可多达 24h

潮霉素（Hygromycin）

原核及真核细胞中蛋白质合成的抑制剂；抑制 70S 核糖体的转位，引起 mRNA 的错读。大肠杆菌抗潮霉素 B 的基因被广泛用于多种细胞类型中的重组克隆的筛选。

市售的潮霉素 B 为水溶液。每批产品说明中标有实际活性和浓度。所用浓度必须通过试验确定。

离子霉素（Ionomycin）

Ca^{2+} 载体。用于增加细胞内 Ca^{2+} 浓度和测定细胞浆中游离的 Ca^{2+} 浓度。较

A23187 更有效，无荧光。

溶于：DMSO、甲醇

储存浓度：1mmol/L（4℃避光储存）

工作浓度：通常为 1μmol/L

孵育时间：15～30min

KN-62

Ca^{2+}/钙调蛋白激酶Ⅱ（K_i=0.9μmol/L）有效的选择性抑制剂，比 CaM 激酶Ⅱ的 K_i值高 2 个数量级，但较蛋白激酶 C、蛋白激酶 A 和肌球蛋白轻链激酶的小。CaM 激酶Ⅱ的第二种抑制剂——KN-93，更易溶于水，对 CaM 激酶Ⅱ同样具有选择性（K_i=0.3μmol/L）。抑制激动剂引起 Ins（1，4，5）$P_3$3-激酶的激活。抑制 3T3-L1 胚胎成纤维细胞向脂肪细胞的分化。具有无活性的类似物。

溶于：DMSO

储存浓度：10mmol/L（4℃储存）

工作浓度：2～10μmol/L

孵育时间：30min（至多可孵育细胞达 48h）

Lactacystin

一种细胞通透性的不可逆的蛋白酶体抑制剂。通过作用于起催化作用的β亚单位阻断蛋白酶体的活性。诱导 Neuro 2A 小鼠成神经细胞瘤细胞的神经轴突的外长，抑制同步化的 Neuro 2A 和 MG-63 人骨肉瘤细胞越过 G_1 期。抑制 NFκB 的激活。已明确蛋白酶体在多种 ER 蛋白的降解中起作用。

溶于：DMSO

储存浓度：10mmol/L（－20℃储存）

工作浓度：10～20μmol/L

孵育时间：1～12h

Latrunculin A

抑制肌动蛋白聚合，破坏微丝组织以及微丝介导的过程；比细胞松弛剂的作用强 10～100 倍。细胞松弛素诱导 F-肌动蛋白的解聚，及培养的成纤维细胞中应力纤维（stress-fiber）的收缩，Latrunculins（A 和作用稍小的 B）可引起应力纤维缩短和增粗。此外，Latrunculins 可以隔离肌动蛋白单体，而细胞松弛素可以使肌动蛋白保持低聚合状态。因此，两类化合物可能作用靶点不同。可逆性。

可溶于：DMSO、乙醇

储存浓度：10mg/ml（－20℃储存）

工作浓度：0.2～10μg/ml

孵育时间：1～12h

细霉素 B（Leptomycin B）

有效的 NES 依赖性核输出蛋白的特异性抑制剂；与核输出受体 CRM1 结合。具有抗真菌和抗肿瘤作用，可抑制人免疫缺陷病毒 1 型调节蛋白 Rev 的核浆转位，且有明显的抗增殖活性。

溶于：乙醇

储存浓度：100μmol/L～1mmol/L（－20℃储存）

工作浓度：10～100nmol/L

孵育时间：30min～3h

亮抑肽酶（Leupeptin）

类胰岛素和半胱氨酸蛋白酶（包括胰岛素、纤维蛋白溶酶、蛋白激酶 K、木瓜蛋白酶、凝血酶及组织蛋白酶 A 和 B）可逆抑制剂。可抑制 T 淋巴细胞被激活后的程序性细胞死亡。

溶于：水

储存浓度：1～10mmol/L（－20℃储存）

工作浓度：10～100μmol/L

孵育时间：15min 至数小时

洛伐他汀（Lovastatin）

抗高胆固醇药和羟甲基戊二酸单酰辅酶 A（HMG-CoA）还原酶的抑制剂；可减少储存的内源性甲羟戊酸，从而阻断蛋白的异戊二烯化（isoprenylation）和胆固醇的合成。对细胞具有多种效应。可阻断 *N-ras* 癌基因诱导的神经分化，抑制生长因子信号，使细胞停留在 G_1 晚期。

溶于：DMSO、乙醇

储存浓度：4mg/ml（－20℃储存）

工作浓度：20μmol/L

孵育时间：6～24h

LY294002（PI 3 激酶抑制剂）

磷酸肌酸 3 激酶的可逆的抑制剂，作用于酶的 ATP 结合位点。不影响 EGF 受体激酶、MAP 激酶、PKC、PI4 激酶、S6 激酶和 c-src 的活性。抑制培养的兔主动脉平滑肌细胞增殖，但不诱导凋亡。渥曼青霉素的选择性和效应更强，但不可逆。

溶于：DMSO、乙醇

储存浓度：1～10mmol/L（－20℃、分装储存）

工作浓度：1～2μmol/L

孵育时间：15min～3h

溶血磷脂酸（LPA）

通过异三聚体 G 蛋白（主要为 G_i 和 G_q）激活多种信号通路，包括抑制腺苷酸环化酶，激活 Ras 和 Raf/MAP 激酶途径，刺激磷酸酶 C 和 D 和通过激活 Rho 促使应力纤维的生成。

溶解性：可准备 10mg/ml 的储存液，溶于 95∶5∶5 的氯仿/甲醇/乙酸中（应用纯净水）。在二甲基亚砜（DMSO）或甲醇中的溶解度有限。据报道，5mg/ml（～11mmol/L）的油酰 LPA 钠盐易溶于不含钙和镁的缓冲液中（Jalink et al. 1990）。在 0.1%（w/v）的 BSA（基本不含脂肪酸）的存在下，也可溶于 pH7.4 的磷酸缓冲盐（PBS）中，或 pH7.4 的不含钙和镁的 Dulbecco's PBS（CMF-DPBS）中（见附录 1），浓度最高为 3mmol/L（0.14mg/ml）。

储存：LPA 在中性溶液中应该是稳定的。推荐冻存溶液或分装储存。对某些特殊

用途需保存于惰性气体（氮气或氩气）中。

工作浓度：任何情况下从500nmol/L（孵育1h）～100μmol/L（孵育15min）

蜂毒肽（Mastoparan）

具有相对细胞通透性的合成肽，可以通过与G蛋白藕联受体类似的机制直接激活百日咳毒素敏感的G蛋白。优先作用于G_i和G_o，而非G_s。可刺激侵袭性细胞分泌胰岛素，增加细胞内Ca^{2+}的水平。抑制钙调蛋白和激活磷酸酶A_2。

溶于：水

储存浓度：1mmol/L（－20℃储存）

工作浓度：10～50μmol/L

孵育时间：15min～1h

MG-132

有效的、可逆的及具细胞通透性的蛋白酶体抑制剂。通过26S复合物减少泛素结合蛋白的降解，而不影响其ATP酶或异肽酶的活性。已被用于在ER中包含蛋白酶体的膜蛋白的分离，包括CFTR（参见Lactacystin）。抑制NFκB的激活。

溶于：DMSO

储存浓度：10～100mmol/L（－20℃储存）

工作浓度：20～200μmol/L

孵育时间：30min～24h

微囊藻毒素LR（Microcystin-LR）

环形七肽；蛋白磷酸酶1和2A（PP-1和PP-2）的强有效的抑制剂。与岗田酸（okadaic acid）不同，微囊藻毒素-LR对PP-1（K_i＝1.7nmol/L）和PP-2（K_i＝0.04nmol/L）的效应相同。对蛋白激酶没有效应，使其在蛋白激酶试验中，可有效的降低磷酸酶污染的效应。非细胞通透性，但可以通过多种特异性器官的阴离子载体进入肝细胞。

溶于：DMSO、乙醇和甲醇

储存浓度：1mmol/L（－20℃储存）

工作浓度：肝细胞中1～5μmol/L；体外10μmol/L

孵育时间：15min～1h

L-含羞草碱（L-Mimosine）

DNA复制抑制剂，通过抑制复制叉的形成起作用。L-含羞草碱可阻断喜树碱诱导的PC12细胞凋亡，而蚜肠霉素（aphidicolin）则不能。

溶于：水

储存浓度：10mmol/L（室温保存）

工作浓度：25～400μmol/L

孵育时间：2～24h

ML-7（MLCK抑制剂）

有效的、具有细胞通透性的肌球蛋白轻链激酶的选择性抑制剂（K_i＝300nmol/L）。高浓度时可抑制蛋白激酶A（K_i＝21μmol/L）和蛋白激酶C（K_i＝42μmol/L）。

溶于：DMSO、乙醇、水

储存浓度：100～500mmol/L（4℃避光储存）

工作浓度：10～50μmol/L

孵育时间：15min～1h

进一步信息详见 *Biomol Catalog and Handbook*，5th ed. 中的表Ⅰ（激酶抑制剂的选择性）。

孟宁素（Monensin）

作为 Na^+ 离子载体起作用的聚醚抗生素。与单价阳离子形成稳定的复合物，可以穿过细胞膜。通过阻断向高尔基体的蛋白质运输而抑制糖蛋白的分泌。可中和内膜的酸性环境。降低神经磷脂酶的活性。

溶于：DMSO、甲醇

储存浓度：2～30mmol/L（4℃储存）

工作浓度：1～30μmol/L

孵育时间：数秒内有效；至多可达 3h

尼日利亚菌素（Nigericin）

作为 K^+/H^+ 离子交换器的逆向转运离子载体。可通过破坏膜电位刺激线粒体释放 Ca^{2+}。当与 K^+ 离子通道如缬安霉素联合起作用时可调整胞浆 pH。

溶于：乙醇

储存浓度：1mg/ml（4℃储存）

工作浓度：1～10μmol/L

孵育时间：2～5min 内有效

诺考达唑（Nocodazole）

对培养的哺乳动物细胞具有独特的抗微管活性。促进微管解聚。纳摩尔浓度可改变微管的动力学，干扰成纤维细胞的运动，而不影响聚合体的功能。使细胞停滞在有丝分裂期。

溶于：DMSO

储存浓度：10～30mmol/L（室温保存）

工作浓度：50nmol/L（低浓度）～30μmol/L（有效的微管解聚浓度）

孵育时间：用诺考达唑预孵育细胞，置于冰上 15min，可使微管迅速解聚；至多可达 24h。

岗田酸（Okadaic acid）

多种细胞类型中蛋白磷酸酶，尤其是 PP-1 类（K_i＝10～15nmol/L）和 PP-2A 类（K_i＝0.1nmol/L）的有效抑制剂。不影响酸性或碱性酪氨酸磷酸酶的活性。有类似胰岛素的效应，可增加神经递质的释放，引起血管舒张，且是有效的肿瘤促进剂。可诱导高尔基器的分散。岗田酸是研究丝氨酸/苏氨酸磷酸化所调节的细胞过程的有效工具。

溶于：DMSO、乙醇、甲醇

储存浓度：1mmol/L（－20℃避光储存）

工作浓度：50～200nmol/L

孵育时间：15min～2h

可使细胞变圆。进一步信息详见 *Alexis Biochemicals* 中的＃18 技术注解。

Olomoucine

腺嘌呤衍生物，低浓度时，为与 ATP 结合并抑制 p34^{cdc2}/周期素 B（$K_i = 7\mu mol/L$）及几种其他 CDK 的竞争性抑制剂。1mmol/L 的浓度下并不明显影响其他蛋白激酶的活性。抑制 IL-2 刺激的 T 淋巴细胞中的 DNA 合成。也用于将细胞同步化在 G_1 期。更高浓度可影响微管动力学。

溶于：DMSO

储存浓度：100mmol/L（−20℃、分装储存）

工作浓度：通常 10μmol/L（最高达到 100μmol/L）

孵育时间：据研究的过程 15min～24h 不等

进一步信息详见 *Alexis Biochemicals* 中的＃25 技术注解。

乌本苷（Quabain）

选择性的 Na^+/K^+-ATP 酶抑制剂。可使 Ca^{2+} 内流；也可启动快速的蛋白激酶 C 依赖的早期应答基因的诱导。

溶于：水

储存浓度：100mmol/L（−20℃避光储存）

工作浓度：1～100μmol/L

孵育时间：30min～24h

PD98059（MEK 抑制剂）

MAP 激酶激酶（MEK 或 MAPK/ERK 激酶）的有效选择性抑制剂。阻断 MEK 的活性，因此抑制 MAP 激酶的磷酸化和激活。抑制细胞生长，逆转 ras 转化的 3T3 小鼠成纤维细胞和大鼠肾细胞的表型。在体外抑制高尔基体重新装配。具有细胞通透性。

溶于：DMSO

储存浓度：50mmol/L（−20℃避光储存）

工作浓度：10～50μmol/L

孵育时间：30min～2h

PDMP

研究细胞鞘糖脂消耗效应的有用工具。通过抑制 UDP-葡萄糖：神经酰胺葡萄糖转移酶（葡糖苷酰鞘氨醇）而阻断神经酰胺的糖基化。具有抗肿瘤活性；使 3T3 细胞停滞在 G_1/S 和 G_2/M 期。降低 A431 细胞对志贺菌毒素（Shiga toxin）的敏感性。减慢 CHO 细胞和 BHK－21 细胞中囊泡的顺梯度运输及内吞作用。将顺面-高尔基蛋白重新分配至 ER。

溶于：乙醇

储存浓度：10～100mmol/L（4℃储存）

工作浓度：20～100μmol/L

孵育时间：据研究过程 1～18h 不等

胃酶抑素（Pepstatin A）

天冬氨酸蛋白酶，包括胃蛋白酶、肾素、组织蛋白酶 D、HIV-1 蛋白酶的抑制剂。抑制大鼠肝脏细胞中 ApoB 的降解；抑制细胞因子诱导的程序性细胞死亡。加速小鼠淀粉状纤维的形成。

溶于：DMSO

储存浓度：10～35mmol/L（－20℃储存）

工作浓度：细胞中 50～100μmol/L

孵育时间：30min～2h

百日咳毒素（Pertussis toxin）

蛋白质内毒素，可催化 G 蛋白 G_i、G_o和 G_t的 GDP 结合的 α 亚单位的 ADP-核糖基化。使 G 蛋白与受体解偶联，因此使 G 蛋白处于失活状态。用于研究腺苷酸环化酶的调节及 G_i蛋白作用。由两个亚单位组成：一个为具有酶活性的 A 原体亚单位（S-1），既有 NAD^+糖水解酶活性，又有 ADP 核糖基化作用；另一个为 B 低聚体亚单位（S-2、S-3、S-4 和 S-5），在细胞表面的黏附中起作用。

储存溶液：溶于水中的重组的商业制剂。通常，市售的百日咳毒素（Akexis Biochemicals，Biomol，Calbiochem）为 50μg 的蛋白溶于 10mmol/L 磷酸钠缓冲液，重悬于 0.5ml 水时为 pH 7.0/ 50mmol/L 氯化钠溶液。百日咳毒素为一种难溶的蛋白质，用前轻轻摇匀。储存液 4℃保存，不可冷冻。

工作浓度：50～100ng/ml

孵育时间：2～24h

氧化苯胂（Phenylarsine oxide，PAO）

具细胞通透性的磷酸化酪氨酸磷酸酶抑制剂（K_i＝18μM）。剂量依赖性地诱导大鼠腹膜巨噬细胞、人包皮成纤维细胞和培养的人内皮细胞内游离 Ca^{2+}浓度的增加，而对细胞内储存 Ca^{2+}没有影响。抑制胰岛素对磷脂酰肌醇 3′激酶的激活。二硫键交链的试剂。

溶于：DMSO、氯仿

储存浓度：50mmol/L（室温保存）

工作浓度：10～50μmol/L

孵育时间：任何情况下 15s～2h

佛波酯（Phorbol esters）

佛波酯类（PMA）的一种。极强的肿瘤促进剂。通过模拟甘油二酯（DAG）的作用激活蛋白激酶 C，引起细胞和组织产生广泛的效应。

溶于：DMSO

储存浓度：1mmol/L（－20℃储存）

工作浓度：50nmol/L～3μmol/L

孵育时间：任何情况下可以孵育细胞 5min～48h；在细胞内稳定存在，可导致 PKC 的长时间激活。然而，长期应用会使特定的 PKC 亚型下调。

进一步信息详见 *Alexis Biochemicals* 中的＃13、＃14 技术注解。

Piceatannol

低浓度时，与 Src 家族相比，可抑制肥大细胞和 B 细胞中受体介导的蛋白酪氨酸激酶 Syk 的激活。RBL-2H3 细胞中，抑制 FcεR1 介导的信号传导。

溶于：DMSO、乙醇

储存浓度：10～50mg/ml（4℃避光储存）

工作浓度：10～30μg/ml

孵育时间：1h

PMSF（苯甲基磺酰氟）

抑制丝氨酸蛋白酶，如糜蛋白酶、胰岛蛋白酶和凝血酶以及乙酰胆碱酯酶和半胱氨酸蛋白酶-木瓜蛋白酶（可被 DTT 逆转）。PMSF 通过在活性位点磺化丝氨酸残基而抑制丝氨酸蛋白酶。不抑制金属蛋白酶、大多数半胱氨酸蛋白酶或天冬氨酸蛋白酶。

溶于：以 35mg/ml 的浓度溶于无水异丙醇中加热，产生清澈到稍混浊、无色至浅黄色的液体，或无水乙醇（100%，非 95%）。

储存浓度：17mg/ml（室温保存）

工作浓度：17～170μg/ml

孵育时间：15min～1h

PMSF 在水中非常不稳定。水中 25℃，pH7.0、7.5 和 8.0 时半衰期分别为 110min，55min 和 35min。

嘌呤霉素（Puromycin）

蛋白质合成抑制剂。通过加入到正在合成的肽链末端而引起新生多肽链的提前释放；氨酰 tRNA 的结构类似物。

溶于：水

储存浓度：100 mmol/L（－20℃储存）

工作浓度：10～100μmol/L

孵育时间：5min～1h

雷帕霉素（Rapamycin）

大环内酯类免疫抑制物家族的成员，可结合并抑制亲免素（immunophilin）FK-BP12 的肽脯氨酸异构酶（peptidylproline cis-trans-isomerase，PPIase）的活性；效应器还包括一种称为 FRAP（FKBP12 雷帕霉素相关蛋白）的大蛋白。FKBP12-雷帕霉素可与 Ca^{2+}/钙调蛋白依赖的丝氨酸/苏氨酸磷酸酶-钙调神经磷酸酶结合，但并不抑制其活性。

溶于：DMSO、甲醇、乙醇

储存浓度：2mmol/L（－20℃储存）

工作浓度：1～20nmol/L

孵育时间：30min～1h

叠氮化钠（Sodium azide，NaN_3）

抑制线粒体 ATP 酶；常用于耗尽细胞内的 ATP 水平（常与 50mmol/L 2-脱氧葡萄糖联合使用）。

溶于：水

储存浓度：1mol/L（室温储存）

工作浓度：10～20mmol/L

孵育时间：15～90min

丁酸钠（Sodium butyrate）

一种生理性短链脂肪酸，常用于增加含病毒启动子的转染基因的表达（抑制组氨酸

脱乙酰）。通过将细胞阻滞在G_1期而阻断血清刺激的 DNA 合成。通过 p53 非依赖途径诱导结肠癌细胞凋亡。干扰信号转导过程，包括Ca^{2+}从细胞内储存池的释放。

溶于：水

储存浓度：5mol/L（－20℃储存）

工作浓度：2～5mmol/L

孵育时间：通常＞12h

原钒酸钠（Sodium Orthovanadate）

广谱酪氨酸磷酸酶抑制剂。通过模拟 ATP 的 γ 磷酸化，也抑制其他 ATP 酶，包括Na^+/K^+ ATP 酶、酸性磷酸酶、碱性磷酸酶以及腺苷酸环化酶。肝细胞中，钒酸盐（vanadate）还是一种溶酶体蛋白水解的强效抑制剂，其效应是由于对溶酶体酶的直接抑制。可激活完整细胞中 pp60（v-src）激酶的活性。也可以以快速、浓度依赖性的方式刺激骨骼肌细胞中氨基酸的转运活性。

简单的（VO_4）$^{3-}$离子的水溶液包含十二种或更多的离子种类，有单体也有寡聚体，其丰度依赖 pH 和［VO_4］$^{3-}$浓度。见 Fohr 等（1989）编写的制备单体原钒酸指南。钒酸离子易进入细胞的原因尚不清楚（可能通过阴离子载体）。最大抑制浓度时，钒酸可能产生副作用，这限制了其在细胞培养中的应用。与过氧化氢联用（形成过氧化钒酸）可促进其进入细胞（将 100μl 0.1mol/L 的原钒酸，900μl 水和 3.3μl 30％的H_2O_2混合；1∶100 稀释的上述液体作用于细胞）。然而，还应该检测过氧化氢本身的效应。

溶于：水

储存浓度：100mmol/L（室温储存）。为了保证单体的存在，煮沸溶液至半透明状态，将 pH 调整至 10.0。分装溶液于塑料容器中冻存。煮沸之前呈橘色的原因是十钒酸（decavanadate）的存在。pH10.0 时，几个小时后将逐渐转变为无色的单体钒酸盐（monovanadate）。若无适当的预防措施（例如，pH、氧化状态、掺杂的混合物和浓度的控制），钒（vanadyl）、偏钒酸盐（metavanadate）、原钒酸盐（orthovanadate）以及十钒酸（decavanadate）在水中会相互转变。

工作浓度：200μmol/L～2mmol/L

孵育时间：15min～2h

星形孢菌素（Staurosporine）

有效的具细胞通透性的蛋白激酶抑制剂，对蛋白激酶 C（K_i＝0.7nmol/L）、蛋白激酶 A（K_i＝7nmol/L）以及肌球蛋白轻链激酶（K_i＝1.3nmol/L）的抑制作用最强。可与 ATP 结合位点相互作用。诱导 MCF-7 细胞凋亡，但不引起细胞 DNA 的断裂。使正常细胞停滞在G_1检查点。

溶于：DMSO、甲醇

储存浓度：1mmol/L（－20℃，避光储存）

工作浓度：10～200nmol/L

孵育时间：根据不同检测手段，15min～24h 不等

进一步信息详见 *Biomol Catalog and Handbook*，5th ed. 中的表 1（激酶抑制剂的选择性）。

紫杉醇（Taxol，paclitaxel）

抗肿瘤及抗白血病药物。促进微管装配，抑制微管解聚。数小时后使微管装配成束。与诺考达唑（nocodazole）相似，纳摩尔水平的紫杉醇可抑制微管动力学，而不影响整个聚合体。将细胞阻滞在 G_2/M 期。诱导多种细胞凋亡。

溶于：DMSO、甲醇

储存浓度：20mmol/L（－20℃，避光储存）

工作浓度：10nmol/L～20μmol/L

孵育时间：紫杉醇可快速稳定微管（数分钟之内），尽管将微管捆扎成束需要数小时[预先冰浴使多聚体解聚或用低浓度的诺考达唑（nocodazole）冲洗细胞可以促进紫杉醇的这一效应]。

Thapsigargin

肌浆网（SR）/内质网（ER）Ca^{2+}-ATP 酶的有效抑制剂。诱导 IP_3依赖的 Ca^{2+} 从内质网中释放，引起细胞内 Ca^{2+} 浓度升高。细胞内 Ca^{2+} 的消耗可诱导应激反应，使蛋白质折叠和加工发生缺陷。诱导大鼠胸腺细胞和人肝癌细胞的凋亡。作用可逆。

溶于：DMSO、乙醇

储存浓度：1mmol/L（－20℃，分装，避光储存）

工作浓度：20nmol/L～1μmol/L

孵育时间：15s～2min 可使细胞内 Ca^{2+} 升高；根据所分析的效应可孵育更长时间。

进一步信息详见 *Alexis Biochemical* 中的＃15 技术注解。

三氟拉嗪（Trifluoperazine）

钙调蛋白拮抗剂。10μmol/L 浓度时，增强由激动剂引起的胞浆钙离子浓度的升高。更高浓度时可拮抗钙调蛋白的作用。抑制活化的 Jurkat T 细胞分泌 IL-2。结构不同于 W-7。

溶于：水（二氢氯化盐）

储存浓度：10mmol/L（4℃储存）

工作浓度：10～50μmol/L

孵育时间：10min～3h

衣霉素（Tunicamycin）

核苷抗生素，可通过阻断 *N*-乙酰氨基葡萄糖-1-磷酸从 UDP-*N*-乙酰氨基葡萄糖转位至一磷酸盐长醇（dolichol monophosphate），而特异性地抑制 N 端的糖基化；对其他糖基化形式如丝氨酸/苏氨酸连接的寡糖没有效应。可引起内质网中多种糖蛋白的错误折叠和滞留，诱导内质网伴随蛋白的合成。

溶于：DMSO、乙醇

储存浓度：10mg/ml（－20℃储存）

工作浓度：1～10μg/ml

孵育时间：细胞可被处理 1～24h

酪氨酸磷酸化抑制蛋白（Tyrphostins）

属于酪氨酸激酶抑制剂大家族。抑制细胞受体如 EGF 和 PDGF 受体。

溶于：DMSO、乙醇

储存浓度：20～100mmol/L（－20℃，避光储存）

工作浓度：10～150μmol/L

孵育时间：任何情况均为1～48h

进一步信息详见 *Alexis Biochemicals* 中的＃22技术注解及 *Biomol Catalog and Handbook*，5 th ed. 中的表Ⅱ（酪氨酸蛋白激酶抑制剂的选择性）。

缬氨霉素（valinomycin）

钾离子载体。通过降低线粒体膜的膜电位而减少ATP的合成。有报道称可抑制NGF诱导的神经元分化。与尼日利亚菌素（nigericin）合用来调整细胞质的pH。

溶于：DMSO

储存浓度：1mmol/L（室温储存）

工作浓度：1～20μmol/L

孵育时间：通常为15min～2h

长春花碱（Vinblastine）

长春花碱药物；抗肿瘤药物。通过干扰纺锤体微管的功能抑制细胞增殖。与微管结合，抑制微管动力学。高浓度时可使微管解聚。诱导培养的肝脏细胞和人淋巴瘤细胞凋亡。另一种植物碱药物，长春新碱，效应类似但不相同。

溶于：甲醇

储存浓度：20mmol/L（4℃避光储存）

工作浓度：＜10 nmol/L（抑制微管运动）；100nmol/L～1μmol/L（微管解离）；＞10μmol/L（形成非微管聚合体）

孵育时间：30min～24h

W-7

属于钙调蛋白拮抗剂家族，抑制 Ca^{2+}/钙调蛋白调节的酶活性。W-7抑制 Ca^{2+}/钙调蛋白诱导的肌球蛋白轻链激酶（K_i＝51μmol/L）和磷酸二酯酶（K_i＝28μmol/L）的激活。抑制布雷菲尔德菌素（brefeldin A）处理的细胞中膜的管化。

溶于：水

储存浓度：10～100mmol/L（4℃，避光储存）

工作浓度：10～100μmol/L

孵育时间：30min～2h

渥曼青霉素（Wortmannin）

磷酸肌酸3激酶（PI 3激酶）的选择性、强抑制剂；可与激酶形成共价联系，因此，为可逆性的。消除成纤维细胞中PDGF介导的Ins（3，4，5）P_3的形成。抑制分离的大鼠脂肪细胞中胰岛素的代谢作用，但不影响胰岛素受体酪氨酸激酶活性。抑制TGN来源的转运小泡的形成。渥曼青霉素可在形态上和功能上诱导人胚胎未分化细胞分化为内分泌细胞。

溶于：DMSO

储存浓度：1～20mmol/L（－20℃，避光，分装储存）

工作浓度：10～100nmol/L

孵育时间：30min～4h

在纳摩尔浓度，渥曼青霉素对 PI 3 激酶具有特异性，而更高浓度时也影响其他激酶。一旦稀释成水溶液，渥曼青霉素较不稳定，因此应该现用现配。

撰稿人：Nelson B. Cole

2C 放射性同位素的数据

表 A. 2C. 1 常用放射性核素的物理性质[a]

核素	半衰期	射线	最大能量/MeV	最大辐射范围	在 100%富集时的大约比活性/(Ci/mg)	衰变后得到的原子	靶器官
^{3}H	12.43 年	β	0.0186	0.42cm(空气)	9.6	$^{3}_{2}He$	全身
^{14}C	5370 年	β	0.156	21.8cm(空气)	4.4m Ci/mg	$^{14}_{7}N$	骨、脂肪
^{32}P[b]	14.3 天	β	1.71	610cm(空气)	285	$^{32}_{16}S$	骨
				0.8cm(水)			
				0.76cm(有机玻璃)			
^{33}P[b]	25.4 天	β	0.249	49cm	156	$^{33}_{16}S$	骨
^{35}S	87.4 天	β	0.167	24.4cm(空气)	43	$^{35}_{17}Cl$	睾丸
^{125}I[c]	60 天	γ	0.27～0.035	0.2mm(铅)	14.2	$^{125}_{52}Te$	甲状腺
^{131}I[c]	8.04 天	β	0.606	165cm(空气)	123	$^{130}_{54}Xe$	甲状腺
		γ	0.364	2.4cm(铅)			

a. 本表以 Lederer 等(1967)和 Shleien(1987)的材料为基础编成。

b. 推荐屏蔽物是有机玻璃，半值层厚度是 1cm。

c. 推荐屏蔽物是铅，半值层厚度是 0.02mm。

表 A. 2C. 2 放射性的转换因子

放射性的测量

测量放射活性的国际标准单位是贝可(Becquerel)：

1 Becquerel(Bq)＝每秒 1 个核衰变

更常用的单位是居里(Curie，简写为 Ci)：

$1Ci = 3.7\times10^{10}$ Bq

$= 2.22\times10^{12}$ 每分钟的核衰变(dpm)

$1mCi = 3.7\times10^{7}$ Bq $= 2.22\times10^{9}$ dpm

$1\mu Ci = 3.7\times10^{4}$ Bq $= 2.22\times10^{6}$ dpm

转化因子

1 天＝1.44×10^{3} min＝8.64×10^{4} s

1 年＝5.26×10^{5} min＝3.16×10^{7} s

每分钟计数(cpm)＝dpm×计数效率

续表

剂量的测定

放射能量吸收的国际标准单位是戈瑞(Gray,简写 Gy):

1Gy=1 焦耳(joule,简写为 J)/kg

能量吸收较早的单位是拉德(rad,简写为 r)和伦琴(Roentgen,简写为 R)

1r=100ergs/g=10^{-2}Gy

1R=0.877r(空气中)=0.93—0.98r(水和组织中)

放射剂量的国际标准单位是希沃特(Sievert,简写为 Sv),它可以被认为是经验决定的一种放射类型的相对生物学效应(RBE)

剂量[Sv]=RBE×剂量[Gy]

RBE=(引起生物学效应的 1 剂量标准放射[Gy])/(引起生物学效应的 1 剂量其他放射[Gy])

常遇见的放射性核素 RBE 等于 1

放射剂量较早的单位是伦琴当量(Roentgen-equivalent-man,简写为 rem)

1rem=0.01 Sv

表 A.2C.3 用于计算经过一定天数后放射活性的衰减因子

如一小瓶含有 1.85MBq (50μCi) 的^{35}S 标记的化合物,在经 33 天后的放射性的量将是:1.85×0.77=1.42MBq;50×0.77=38.5μCi

^{125}I 半衰期:60.0 天

天数＼天数	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18
0	1.000	0.977	0.955	0.933	0.912	0.891	0.871	0.851	0.831	0.812
20	0.794	0.776	0.758	0.741	0.724	0.707	0.691	0.675	0.660	0.645
40	0.630	0.616	0.602	0.588	0.574	0.561	0.548	0.536	0.524	0.512
60	0.500	0.489	0.477	0.467	0.456	0.445	0.435	0.425	0.416	0.406
80	0.397	0.388	0.379	0.370	0.362	0.354	0.345	0.338	0.330	0.322
100	0.315	0.308	0.301	0.294	0.287	0.281	0.274	0.268	0.262	0.256
120	0.250	0.244	0.239	0.233	0.228	0.223	0.218	0.213	0.208	0.203
140	0.198	0.194	0.189	0.185	0.181	0.177	0.173	0.169	0.165	0.161
160	0.157	0.154	0.150	0.147	0.144	0.140	0.137	0.134	0.131	0.128
180	0.125	0.122	0.119	0.117	0.114	0.111	0.109	0.106	0.104	0.102
200	0.099	0.097	0.095	0.093	0.090	0.088	0.086	0.084	0.082	0.081
220	0.079	0.077	0.075	0.073	0.072	0.070	0.069	0.067	0.065	0.064
240	0.063	0.061	0.060	0.058	0.057	0.056	0.054	0.053	0.052	0.051

^{32}P　半衰期:14.3天

天数＼小时数	0	12	24	36	48	60	72	84
0	1.000	0.976	0.953	0.930	0.908	0.886	0.865	0.844
4	0.824	0.804	0.785	0.766	0.748	0.730	0.712	0.695
8	0.679	0.662	0.646	0.631	0.616	0.601	0.587	0.573
12	0.559	0.546	0.533	0.520	0.507	0.495	0.483	0.472
16	0.460	0.449	0.439	0.428	0.418	0.408	0.398	0.389
20	0.379	0.370	0.361	0.353	0.344	0.336	0.328	0.320
24	0.312	0.305	0.298	0.291	0.284	0.277	0.270	0.264
28	0.257	0.251	0.245	0.239	0.234	0.228	0.223	0.217
32	0.212	0.207	0.202	0.197	0.192	0.188	0.183	0.179
36	0.175	0.170	0.166	0.162	0.159	0.155	0.151	0.147
40	0.144	0.140	0.137	0.134	0.131	0.127	0.124	0.121
44	0.119	0.116	0.113	0.110	0.108	0.105	0.102	0.100
48	0.098	0.095	0.093	0.091	0.089	0.086	0.084	0.082
52	0.080	0.078	0.077	0.075	0.073	0.071	0.070	0.068

^{131}I　半衰期:8.04天

天数＼小时数	0	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66
0	1.000	0.979	0.958	0.937	0.917	0.898	0.879	0.860	0.842	0.824	0.806	0.789
3	0.772	0.756	0.740	0.724	0.708	0.693	0.678	0.664	0.650	0.636	0.622	0.609
6	0.596	0.583	0.571	0.559	0.547	0.533	0.524	0.513	0.502	0.491	0.481	0.470
9	0.460	0.450	0.441	0.431	0.422	0.413	0.405	0.396	0.387	0.379	0.371	0.363
12	0.355	0.348	0.340	0.333	0.326	0.319	0.312	0.306	0.299	0.293	0.286	0.280
15	0.274	0.269	0.263	0.257	0.252	0.246	0.241	0.236	0.231	0.226	0.221	0.216
18	0.212	0.207	0.203	0.199	0.194	0.190	0.186	0.182	0.178	0.175	0.171	0.167
21	0.164	0.160	0.157	0.153	0.150	0.147	0.144	0.141	0.138	0.135	0.132	0.129
24	0.126	0.124	0.121	0.118	0.116	0.113	0.111	0.109	0.106	0.104	0.102	0.100
27	0.098	0.095	0.093	0.091	0.089	0.088	0.086	0.084	0.082	0.080	0.079	0.077
30	0.075	0.074	0.072	0.071	0.069	0.068	0.066	0.065	0.064	0.063	0.061	0.059
33	0.058	0.057	0.056	0.054	0.053	0.052	0.051	0.050	0.049	0.048	0.047	0.046
36	0.045	0.044	0.043	0.042	0.041	0.040	0.039	0.039	0.038	0.037	0.036	0.035

^{35}S　　半衰期:87.4 天

周数＼天数	0	1	2	3	4	5	6
0	1.000	0.992	0.984	0.976	0.969	0.961	0.954
1	0.946	0.939	0.931	0.924	0.916	0.909	0.902
2	0.895	0.888	0.881	0.874	0.867	0.860	0.853
3	0.847	0.840	0.833	0.827	0.820	0.814	0.807
4	0.801	0.795	0.788	0.782	0.776	0.770	0.764
5	0.758	0.752	0.746	0.740	0.734	0.728	0.722
6	0.717	0.711	0.705	0.700	0.694	0.689	0.683
7	0.678	0.673	0.667	0.662	0.657	0.652	0.646
8	0.641	0.636	0.631	0.626	0.621	0.616	0.612
9	0.607	0.602	0.597	0.592	0.588	0.583	0.579
10	0.574	0.569	0.565	0.560	0.556	0.552	0.547
11	0.543	0.539	0.534	0.530	0.526	0.522	0.518
12	0.514	0.510	0.506	0.502	0.498	0.494	0.490

^{33}P　　半衰期:25.4 天

天数＼天数	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	1.000	0.973	0.947	0.921	0.897	0.872	0.849	0.826	0.804	0.782
10	0.761	0.741	0.721	0.701	0.683	0.664	0.646	0.629	0.612	0.595
20	0.579	0.564	0.549	0.534	0.520	0.506	0.492	0.479	0.466	0.453
30	0.441	0.429	0.418	0.406	0.395	0.385	0.374	0.364	0.355	0.345
40	0.336	0.327	0.318	0.309	0.301	0.293	0.285	0.277	0.270	0.263
50	0.256	0.249	0.242	0.236	0.229	0.223	0.217	0.211	0.205	0.200
60	0.195	0.189	0.184	0.179	0.174	0.170	0.165	0.161	0.156	0.152
70	0.148	0.144	0.140	0.136	0.133	0.129	0.126	0.122	0.119	0.116
80	0.113	0.110	0.107	0.104	0.101	0.098	0.096	0.093	0.091	0.088
90	0.086	0.084	0.081	0.079	0.077	0.075	0.073	0.071	0.069	0.067
100	0.065	0.064	0.062	0.060	0.059	0.057	0.055	0.054	0.053	0.051
110	0.050	0.048	0.047	0.046	0.045	0.043	0.042	0.041	0.040	0.039
120	0.038	0.037	0.036	0.035	0.034	0.033	0.032	0.031	0.030	0.030

参考文献:Dawson et al.，1986

撰稿人:Jill Meisenhelder and Kentaro Semba

2D 常见荧光的最大吸收和激发波长

表 A. 2D. 1 列出了细胞生物学研究中常见荧光的最大吸收和激发波长。以下信息可用于设计实验和选择合适的滤光器。

撰稿人:Brian Herman

表 A. 2D. 1 常见荧光的最大吸收和激发波长[a]

荧　光	最大吸收波长/nm	最大激发波长/nm
Acridine red	455～600	560～680
Acridine orange	500(DNA)	526(DNA)
	460(RNA)	650(RNA)
Alizarin red	330～560	580
Allophycocyanin	650	660
AMCA-S, AMC	345	445
Aminoactinomycin D	555	655
7-Aminoactinomycin D(7-ADD)	546	647
Aminocoumarin	350	445
Anthroyl stearate	361～381	446
Astrazon brilliant red 4C	500	585
Astrazon orange R	470	540
Astrazon red 6B	520	595
Astrazon yellow 7 CLL	450	480
Atabrine	436	490
Auramine	460	550
Aurophosphine	450～490	515
Aurophosphine G	450	580
BAO 9 (bisaminophenyloxadiazole)	365	395
BCECF	482 (低 pH)	520 (低 pH)
	503(高 pH)	528(高 pH)
Berberine sulfate	430	550
Bisbenzamide	360	600～610
Blancophor FFG solution	390	470
Blancophor SV	370	435
BOBO 1, BO-PRO 1	462	481
BODIPY FL	505	513
BODIPY TMR	542	574
BODIPY TR	589	617

续表

荧　光	最大吸收波长/nm	最大激发波长/nm
Brilliant sulfoflavin FF	430	520
Calcein	494	517
Calcein blue	370	435
Calcium crimson	590	615
Calcium green	506	533
Calcium orange	549	576
Calcofluor RW solution	370	440
Calcofluor white	440	500～520
Calcophor white ABT solution	380	475
Calcophor white standard solution	365	435
5-(and 6-)Carboxy SNARF-1 indicator	548(低 pH)	587(低 pH)
	576(高 pH)	635(高 pH)
6-Carboxyrhodamine 6G	525	555
Cascade blue	400	420
Catecholamine	410	470
CL-NERF	504(低 pH)	587(低 pH)
	514(高 pH)	540(高 pH)
Coriphosphine O	460	575
Coumarin-phalloidin	387	470
Cy3. 18	554	568
Cy5. 18	649	666
Cy7	710	805
DANS (1-dimethylamino-naphaline-5-sulfonic acid)	340	525
Dansyl NH-CH_3 in water	340	578
DAPI	358	461
DiA	456	590
Diamino phenyl oxydiazole(DAO)	280	460
Di-8-ANEPPS	488	605
DiD[$DiIC_{18}$(5)]	644	665
Dimethylamino-5-sulfonic acid	310～370	520
DiL[$DiIC_{18}$(3)]	549	565
DiO[$DiOC_{18}$(3)]	484	501
Diphenyl brilliant flavine 7GFF	430	520
DM-NERF	497(低 pH)	527(低 pH)
	510(高 pH)	536(高 pH)
Dopamine	340	490～520

续表

荧　　光	最大吸收波长/nm	最大激发波长/nm
ELF-97 alcohol	345	530
Eosin	524	544
Erythrosin ITC	530	558
Ethidium bromide	518	605
Euchrysin	430	540
FIF(formaldehyde-induced fluorescence)	405	433
Flazo orange	375～530	612
Fluorescein	494	518
Fluorescein isothiocyanate (FITC)	490	523
Fluo-3	506	526
FM1-43	479	598
Fura-2	363(低钙离子)	512(低钙离子)
	335(高钙离子)	505(高钙离子)
Fura Red	472(低钙离子)	657(低钙离子)
	436(高钙离子)	637(高钙离子)
Genacryl brilliant red B	520	590
Genacryl brilliant yellow 10GF	430	485
Genacryl pink 3G	470	583
Genacryl yellow 5GF	430	475
Gloxalic acid	405	460
Granular blue	355	425
Hematoporphyrin	530～560	580
Hoechst 33258, Hoechst 33342	352	461
3-Hydroxypyrene 5,8,10-trisulfonic acid	403	513
7-Hydroxy-4-methylcoumarin	360	455
5-Hydroxytryptamine(5-HT)	400	530
Intrawhite Cf liquid	360	430
Indo-1	346(低钙离子)	475(低钙离子)
	330(高钙离子)	401(高钙离子)
Leucophor PAF	370	430
Leucophor SF	380	465
Leucophor WS	395	465
Lissamine rhodamine B	570	590
Lucifer yellow CH	428	536
Lucifer yellow VS	430	535
LysoSensor blue DND-192, DND-167	374	425

续表

荧　光	最大吸收波长/nm	最大激发波长/nm
LysoSensor green DND-153，DND-189	442	505
LysoSensor yellow/blue	384(低 pH)	540(低 pH)
	329(高 pH)	440(高 pH)
LysoTracker green	504	511
LysoTracker yellow	534	551
LysoTracker red	577	592
Magdala red	524	600
Magnesium green	506	531
Magnesium orange	550	575
Maxilon brilliant flavin 10GFF	450	495
Maxilon brilliant flavin 8GFF	460	495
MitoTracker green FM	490	516
MitoTracker orange CMTMRos	551	576
Mithramycin	450	570
MPS(methyl green pyronine stilbene)	364	395
NBD	465	535
NBD amine	450	530
Nitrobenzoxadidole	460～470	510～650
Noradrenaline	340	490～520
Nuclear fast red	289～530	580
Nuclear yellow	365	495
Nylosan brilliant flavin E8G	460	510
Oregon green 488 fluorophore	496	524
Oregon green 500 fluorophore	503	522
Oregon green 514 fluorophore	511	530
Pararosaniline(Feulgen)	570	625
Phorwite AR solution	360	430
Phorwite BKL	370	430
Phorwite Rev	380	430
Phorwite RPA	375	430
Phosphine 3R	465	565
Phycoerythrin R	480～565	578
Pontochrome blue black	535～553	605
POPO 1，PO-PRO 1	434	456
Primuline	410	550
Procion yellow	470	600

续表

荧　　光	最大吸收波长/nm	最大激发波长/nm
Propidium iodide	536	617
Pyronine	410	540
Pyronine B	540～590	560～650
Pyrozal brilliant flavin 7GF	365	495
Quinacrine mustard	423	503
R-phycoerythrin	565	575
Resorufin	570	585
RH 414	500	635
Rhodamine 110	496	520
Rhodamine 123	507	529
Rhodamine 5GLD	470	565
Rhodamine 6G	526	555
Rhodamine B	540	625
Rhodamine B 200	523～557	595
Rhodamine B Extra	550	605
Rhodamine BB	540	580
Rhodamine BG	540	572
Rhodamine green fluorophore	502	527
Rhodamine red	570	590
Rhodamine WT	530	555
Rhodol green fluorophore	499	525
Rose Bengal	540	550～600
Serotonin	365	520～540
Sevron brilliant red 2B	520	595
Sevron brilliant red 4G	500	583
Sevron brilliant red B	530	590
Sevron orange	440	530
Sevron yellow L	430	490
SITS(primuline)	395～425	450
SITS(stilbene isothiosulfonic acid)	365	460
SNARF-1	563	639
Sodium green	507	535
Stilbene	335	440
Sulforhodamine B and C	520	595
Sulphorhodamine G Extra	470	570
SYTOX green nucleic acid stain	504	523

续表

荧　光	最大吸收波长/nm	最大激发波长/nm
SYTO green fluorescent nucleic acid stains	494±6	517±17
SYTO green fluorescent nucleic acid stains	515±7	543±13
SYTO 17 red fluorescent nucleic acid stain	621	634
Tetracycline	390	560
Tetraethylrhodamine(rhodamine B)	555	580
Texas red	595	615
Thiazine red R	510	580
Thioflavin S	430	550
Thioflavin TCN	350	460
Thioflavin 5	430	550
Thiolyte	370～385	477～484
Thiozol orange	453	480
Tinopol CBS	390	430
TOTO 1，TO-PRO 1	514	533
TOTO 3，TO-PRO 3	642	660
True Blue	365	420～430
Ultralite	656	678
Uranine B	420	520
Uvitex SFC	365	435
X-Rhodamine	580	605
Xylene orange	546	580
XRITC	582	601
YOYO1，YOYO-PRO1	491	509
YOYO3，YOYO-PRO3	612	613

a. 摘自 Herman(1998)和 Haugland(1996b)的书籍(经允许)。

2E　离心机及转子

本书中描述的离心机转动通常运用相对离心力（RCF；以 g 表示）表示，与特定离心机和转子类型的转速（r/min）相对应。由于每个实验室中设备各不相同，研究者应该会将这些规范运用于其他离心机和转子。

RCF 和转速（r/min）之间的关系见下列方程：

$$RCF = 1.12r[(r/min)/1000]^2$$

式中，r 为转动半径，即被离心物体与旋转轴之间的距离。多数情况下，转速与相对离心力的精确转换（或反之）可用最大的 r 值（即 r_{max}）获得，即转轴与位于离心孔或斗

中的离心管底之间的距离。

表 A. 2E. 1 给出了 Sorvall 公司、Beckman 公司、Coulter 公司、Fisher 公司和 IEC 公司生产的常用转子的 r_{max}值。有时 r_{max}并不能完全准确地代表有效转动半径（如使用适配器将较小的管子放入较大的孔中时）。这种情况下，应当参考转子手册以获得准确的 r 值。最新的信息见生产厂商主页（见网络资源）。

当已知转速和 r_{max}计算 RCF，或已知 RCF 和 r_{max}计算转速时，除使用上述方程外，另一种方法是使用列线图图 A. 2E. 1 和图 A. 2E. 2。

警告：禁止超过最大转速！

注意：本手册中，关于适用于标准、短头 Eppendorf 管的微量离心机的参考值仅包括转速（r/min）。微量离心机转速的“最高速度”和“最大速度”是指 12 000～14 000 r/min。

表 A. 2E. 2 描述了离心管的材料和特性，包括性能、灭菌方法、化学抗性（抵抗各种介质、有机溶剂和乙醇）。

互联网资源

http://www.sorvall.com

http://www.beckmancoulter.com/beckman/biorsch/prodinfo/cntrifug/centuser.asp

http://www/fishersci.com

http://labcentrifuge.com

表 A. 2E. 1　普通转子的最大离心换算值，按照离心机型号分组[a]

转子类型[b]	r_{max}/mm	转子类型[b]	r_{max}/mm
For Sorvall centrifuge models GLC-1, GLC-2, GLC-2B, GLC-3, GLC-4, RT-60000B, T-6000, T-6000B		HL-8 with Omni-Carrier	221
		HL-8 with 50-ml bucket	238
A/S 400	140	HL-8 with 100-ml bucket	247
H-1000B	186	HL-2 and HL-2B	166
HL-4 with 50-ml bucket	180	LA/S400	140
HL-4 with 100-ml bucket	204	***For Sorvall centrifuge models RC-2, RC-2B, RC-5, RC-5B, RC-5C***	
HL-4 with Omni-Carrier	163		
M and A-384 (inner row)	91	GSA	145
M and A-384 (outer row)	121	GS-3	151
SP/X and A-500(inner row)	82	GS-4	147
SP/X and A-500 (outer row)	123	HS-4 with 250-ml bucket	172
For Sorvall centrifuge models RC-3, RC-3B, RC-3C		SA-600	129
H-2000B	261	SE-12	93
H-4000 and HG-4L	230	SH-80	101
H-6000A	260	SM-24(inner row)	91

续表

转子类型[b]	r_{max}/mm	转子类型[b]	r_{max}/mm
SM-24(outer row)	110	JS-5. 2	226
SS-34	107	Microplate carrier(6-bucket rotors)	214
SV-80	101	Microplate carrier(4-bucket rotors)	192
SV-228	90	***For Beckman J2-21 series centrifuges***	
TZ-28	95	JA-10	158
For Sorvall ultracentrifuges		JA-14	137
T-865	91	JA-17	123
T-865. 1	87. 1	JA-18	132
T-875	87. 1	JA-18. 1(25°angle)	112
T-880	84. 7	JA-18. 1(45°angle)	116
T-1270	82	JA-20	108
TFT-80. 2	65. 5	JA-20. 1	115
TFT-80. 4	60. 1	JA-21	102
For Beckman GP series centrifuges		JCF-Z	89
GA-10	123	JCF-Z with small pellet core	81
GA-24	123	JE 6B	125
GA -24 with adapter for 10-ml tubers	108	JS-7. 5	165
GH-3. 7(buckets)	204	JS-13	142
GH-3. 7(microplate carrier)	168	JS-13. 1	140
GH-3. 8(buckets)	204	JV-20	93
GH-3. 8(microplate carrier)	168	***For Beckman series L7 and L8ultracentrifuges***	
For Beckman TJ-6 series centrifuges		SW 25. 1	129. 2
TA-10	123	SW 28	161. 0
TA-24	108	SW 28. 1	171. 3
TA-24 with adapter for 10-ml tubes	123	SW 30	123. 0
TH-4 (stainless steel buckets)	186	SW30. 1	123. 0
TH-4 (100-ml tube holders)	201	SW 40Ti	158. 8
TH-4(microplate carrier)	165	SW 41Ti	153. 1
For Beckman Acou Spin		SW 50. 1	107. 3
AA-10	123	SW 55Ti	108. 5
AA-24	108	SW 60Ti	120. 3
AA-24 with adapter for 10 ml tubes	123	SW 65Ti	89. 0
AH-4	163	Type 15	142. 1
For Beckman J 6 series centrifuges		Type 19	133. 4
JR-3. 2	206	Type 21	121. 5
JS-2. 9	265	Type 25	100. 4
JS 3. 0	254	Type 30	104. 8
JS-4. 0	226	Type 30. 2	94. 2
JS-4. 2	254		
JS-4. 2SM	248		

续表

转子类型[b]	r_{max}/mm	转子类型[b]	r_{max}/mm
Type 35	104.0	***For Beckman Airfuge ultracentrifuges***	
Type 40	80/8	A-95	17.6
Type 40.3	79.5	A-100/18	14.6
Type 42.1	98.6	A-100/30	16.5
Type 42.2Ti	104	A-100	14.7
Type 45Ti	103	ACR-90(2.4-ml liner)	11.8
Type 50	70.1	ACR-90(3.5-ml liner)	13.4
Type 50Ti	80.8	Batch rotor	14.6
Type 50.2Ti	107.9	EM-90	13.0
Type 50.3Ti	79.5	***For Beckman TL-100 series ultracentrifuges***	
Type 50.4Ti(inner row)	96.4	TLA-100	38.9
Type 50.4Ti(outer row)	111.4	TLA-100.1	38.9
Type 55.2Ti	100.3	TLA-100.2	38.9
Type 60Ti	89.9	TLA-100.3	48.3
Type 65	77.7	TLA-45	55.1
Type 70Ti	91.9	TLS-55	76.4
Type 70.1Ti	82.0	TLV-100	35.7
Type 75Ti	79.7	***Miscellaneous centrifuges and rotors***[c]	
Type 80Ti	84.0	Clay Adams Dynac	_[d]
VAV 50	86.4	Fisher Centrific	113
VC 53	78.8	Fiser Marathon 21K with 4-place rotor	160
VTi 50	86.6	IEC Clinical centrifuge with 4-place swinging-bucket rotor	155
VTi 65	85.4		
VTi 65.2	87.9	IEC general-purpose centrifuge models HN, HN-SⅡ, and Centra-4	_[a]
VTi 80	71.1		

a. 如果你的转子未在该表中列出，请参考生产厂家的主页以获取最新信息。Sorvall 公司，www.sorvall.com；Beckman Coulter 公司，www.beckmancoulter.com；beckman/biorsh/prodinfo/cntrifug/centuser.asp；Fisher 公司，www.fishersci.com；IEC 公司，www.labcentrifuge.com。

b. Sorvall 离心机和转子是 Du Pont Company Medical Products 的产品，Beckman 离心机为 Beckman Instruments 产品，IEC 离心机制造商为 International Equiment Co.，Clay AdmsDynac 离心机是 Becton Dickinson Labware 产品，Fisher 离心机由 Fisher Scientific 出品。订货商详情见附录 4。

c. 这些设备经常被称作"医用离心机"、"桌上小型离心机"或"低速离心机"。

d. 这些设备可以使用宽范围的具多种旋转半径的转炉托圈转子，同时也可使用角度可调倾卸斗转子，这种转子在翻转时获得多种适配器使得转子能够旋转多种不同大小和数量的离心管。例如，通常使用的 IEC958 转炉托圈转子依赖选择不同转炉托圈可改变的半径范围在 137～181mm。因此需要参考特殊系统的专业手册以获得 RCF 变化的精确速度。

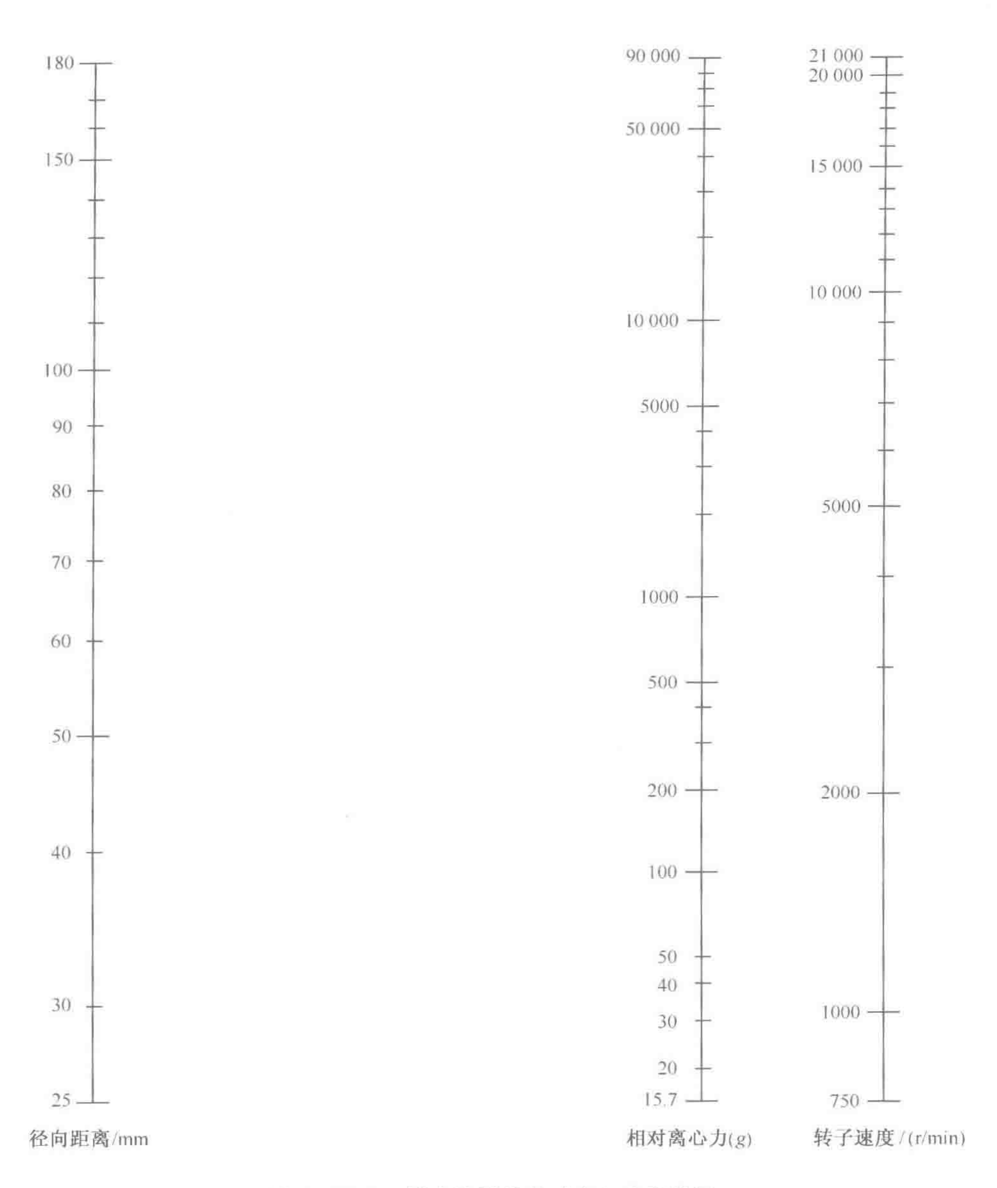


图 A. 2E. 1 低速转子的相对离心力列线图

要确定某一列上的未知值时，用尺子排列其他两列的已知值，所需值落在尺子与第三列的交切处。对于高速离心机(即>21 000r/min)，使用图 A. 2E. 2。使用本附录开始处的方程可获得更精确的值。常见转子的径向距离见表 A. 2E. 1

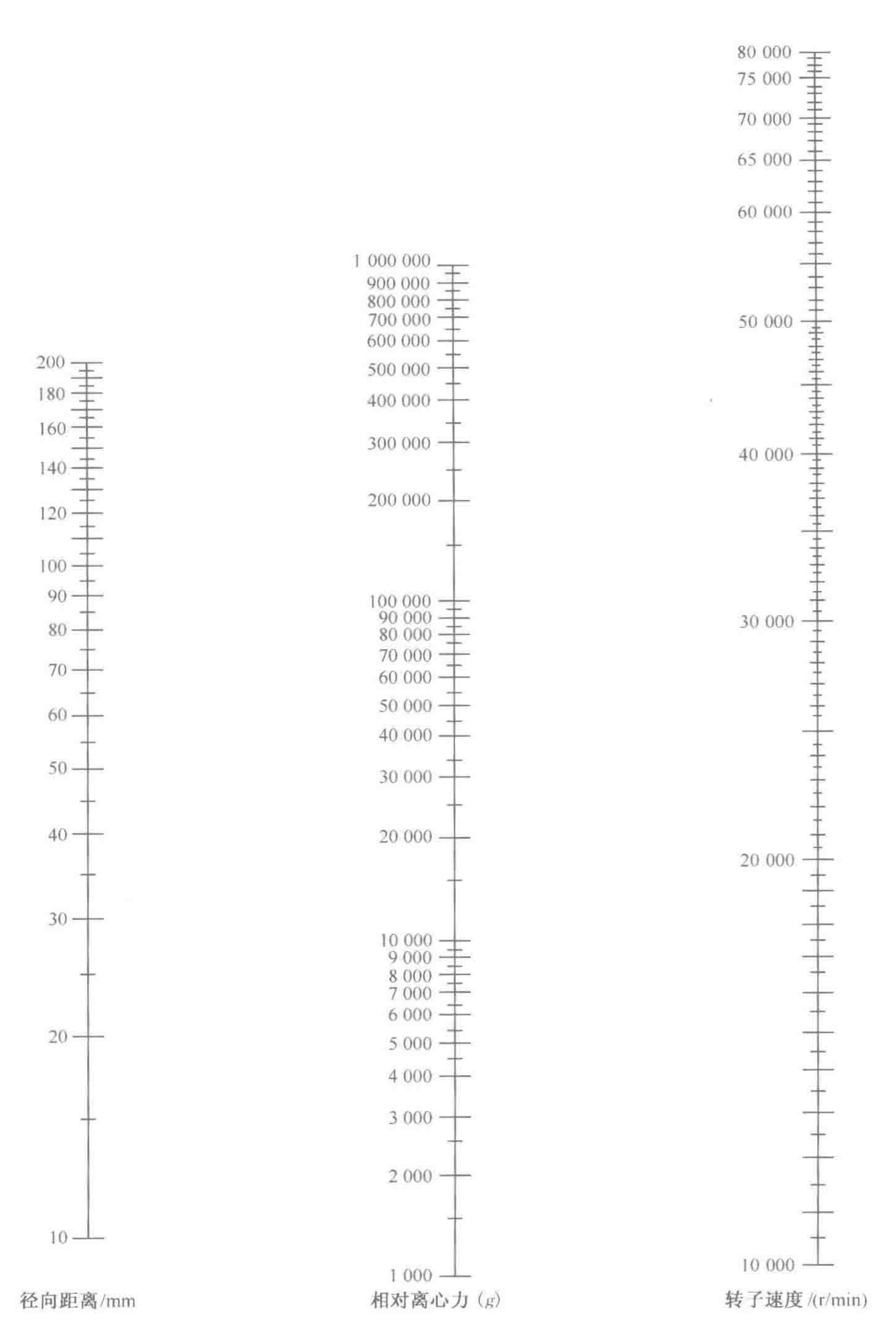


图 A. 2E. 2　高速转子的相对离心力列线图

对于低速离心机的列线图，见 A. 2E. 1 使用本附录开始处的方程可获得更精确的值。常见转子的径向距离见表 A. 2E. 1

表 A. 2E. 2 离心管的材料及其性质[a]

类型	光学性质	可否穿孔	可否分割	可否重复利用	灭菌方法	化学抗性[b]
超净的薄壁	透明	可以	可以		冷无菌处理,但不能用乙醇	除碱性外,对所有的浓度介质都有很好的耐受性。对大多数的弱酸和少数的弱碱是安全的。对 DMSO 和大多数的有机溶剂,包括所有的乙醇溶剂都是不安全的
标准管				可以		
快速封口管				不可以		
多聚薄壁	半透明	可以	可以		能在 121℃ 高压灭菌	对所有的浓度介质都有很好的耐受性,包括碱。对大多数的酸、碱、乙醇、DMSO 和有机溶剂是安全的
标准管				可以		
快速封口管				不可以		
多聚厚壁	半透明				能在 121℃ 高压灭菌	对所有的浓度介质都有很好的耐受性,包括碱。对大多数的酸、碱、乙醇、DMSO 和有机溶剂是安全的
管		不可以	不可以	可以		
瓶		不可以	不可以	可以		
聚碳酸酯厚	透明	不可以	不可以		冷无菌处理,但不能用乙醇,能在 121℃ 高压灭菌,但会减少管子的使用时间	除碱性外,对所有的浓度介质都有很好的耐受性。对大多数的弱酸和少数的弱碱是安全的。对 DMSO 和大多数的有机溶剂,包括所有的乙醇溶剂都是不安全的
管				可以		
瓶				可以		
纤维素丙酸酯管	透明	不可以	不可以	可以	冷无菌处理,但不能用乙醇	对所有的浓度介质都有很好的耐受性,包括碱。对大多数的酸、碱、乙醇和有机溶剂是安全的
聚丙烯	半透明	不可以	不可以		能在 121℃ 高压灭菌	对所有的浓度介质都有很好的耐受性,包括碱。对大多数的酸、碱、乙醇是安全的。对大多数有机溶剂是不安全的
管				可以		
瓶				可以		
不锈钢管	不透明	不可以	不可以	可以	能在 121℃ 高压灭菌	对大多数有机溶剂是安全的,对多数的浓度介质和盐有抵抗性,对大多数的酸和碱是不安全的
聚乙烯管	半透明	不可以	不可以	可以	能在 121℃ 高压灭菌	对很广范围的化学物质有很好的耐受性。适合用于强酸和强碱。对大多数有机溶剂是不安全的
透紫外线玻璃/耐热玻璃	透明	不可以	不可以		能在 121℃ 高压灭菌	对很广范围的浓度介质有很好的耐受性。透紫外线玻璃的对酸和碱有很强的耐受性
管				可以		
瓶				可以		

a. 该表格经 Beckman 公司允许。

b. 这里所描述的化学抗性只是一个普通术语,并不是通过 Beckman 公司或 John Wiley & Sons 公司表达或暗示基于这种抗性的安全保证。如果对是否能够抗某种特殊的溶剂,就应该在真实可行的条件下进行测试,以评估管子材料的耐受性。需要更多的有关特殊介质和溶剂的信息,请咨询 Beckman 公司。对于高压蒸汽易燃的溶剂就不能在离心机附近操作,因为可能会被火花,继电器接触或电动机刷子点燃。

(刘　伟　朱自强 译)

附录3 常用技术

3A 分光光度计测量蛋白质浓度

基本方案1 用A_{280}测定蛋白质浓度

通过测量在280nm处的吸收值(A_{280})测定蛋白质浓度是基于浓度为20～3000μg/ml的蛋白质溶液中芳香氨基酸(苯丙氨酸和酪氨酸)和胱氨酸(二硫键连接的半胱氨酸残基)对紫外光(UV light)的吸收。

材料(带√项见附录1)

√ 3mg/ml标准蛋白溶液(任选)
  样品蛋白质
  具有UV光源的分光光度计

1. 用标准品进行校正:3 mg/ml标准蛋白(芳香族氨基酸含量与样品相同)溶液用样品相同的溶剂制备稀释液:20、50、100、250、500、1000、2000和3000μg/ml。空白对照仅含溶剂。表A. 3A. 1中是对A_{280}测量有干扰的物质。

   3 mg/ml BSA溶液是常用的标准溶液,由于1%(w/v)BSA溶液的A_{280}为6.61,因此3mg/ml BSA对应A_{280}为1.98。

2. 打开分光光度计的UV灯,将波长设为280nm。测量前机器需预热30min。用空白溶剂调零。
3. 测量蛋白标准品和样品溶液的吸收值。如果样品蛋白的$A_{280}>2.0$,则用相同的溶剂作进一步稀释,再测量A_{280}。

4a. 如果已知蛋白质的a_{280}:将它的吸收值代入方程A. 3A. 1计算未知样品浓度。在这个方程中,a_{280}的单位是ml/(mg · cm),b是光路长度(单位是cm,假定为1cm)

$$\text{浓度(mg/ml)}=\frac{A_{280}}{a_{280}\times b}$$

方程A. 3A. 1

4b. 如果使用标准品定量:通过对A_{280}-标准品浓度作图或回归分析建立校正曲线。用样品蛋白质吸收值从校正曲线上得到浓度。

5. 如果已知蛋白质的氨基酸组成,它的吸收度可以用方程A. 3A. 2计算。一旦已知吸收率(从出版的数据中获得——如表A. 3A. 2和表A. 3A. 3,或者通过计算获得),它即可用方程A. 3A. 3或方程A. 3A. 4转化为浓度。

$$\varepsilon_{280}=(\text{Trp 数})(5500)+(\text{Typ 数})(1490)+(\text{胱氨酸数})(125)$$

方程A. 3A. 2

$$浓度(mg/ml)=\frac{A_{280}\times 10}{A^{1\%}\times b}$$

方程 A.3A.3

表 A.3A.1 A_{205} 和 A_{280} 蛋白质分析中干扰物质的浓度限制[a]

试剂[b]	A_{205}	A_{280}
硫酸铵	9%(w/v)	>50%(w/v)
Brij 35	1%(v/v)	1%(v/v)
DTT	0.1mmol/L	3mmol/L
EDTA	0.2 mmol/L	30 mmol/L
甘油	5%(v/v)	40%(v/v)
KCl	50 mmol/L	100 mmol/L
2-ME	<10 mmol/L	10mmol/L
NaCl	0.6mol/L	>1mol/L
NaOH	25 mmol/L	>1mol/L
磷酸缓冲液	50 mmol/L	1mol/L
SDS	0.10%(w/v)	0.10%(w/v)
蔗糖	0.5 mol/L	2mol/L
Tris 缓冲液	40 mmol/L	0.5mol/L
Triton X-100	<0.01%(v/v)	0.02%(v/v)
TCA	<1%(w/v)	10%(w/v)
尿素	<0.1mol/L	>1mol/L

a. 数值来自 Stoscheck(1990)。

b. 缩写：DTT，二硫苏糖醇；EDTA，乙二胺四乙酸；2-ME，2-巯基乙醇；SDS，十二烷基硫酸钠；TCA，三氯乙酸。

表 A.3A.2 氨基酸的最大吸收波长和摩尔吸收率 (ε)[a]

氨基酸	最大波长/nm	ε×10⁻³/[1/(mol·cm)]
半胱氨酸	250	0.3
组氨酸	211	5.9
苯丙氨酸	188	60.0
	206	9.3
	257	0.2
色氨酸	219	47.0
	279	5.6
酪氨酸	193	48.0
	222	8.0
	275	1.4

a. 数值适用于 pH7.1 的水溶液(Freifelder 1982；Fasman 1989)。

表 A.3A.3　氨基酸在 280nm 的摩尔吸收率(ε)[a]

氨基酸	$\varepsilon \times 10^{-3}$/[l/(mol·cm)]
胱氨酸	0.110
苯丙氨酸	0.0007
色氨酸	5.559
酪氨酸	1.197

a. 该数值是在 pH7.1 的水溶液中测得的，但胱氨酸除外，其数值在纯水中测定。(Fasman，1989)。

$$\text{浓度 (mg/ml)} = \frac{A_{280} \times \text{分子质量}}{\varepsilon_{280} \times b}$$

方程 A.3A.4

核酸在 280nm 的吸收率很大，它会干扰粗样品中蛋白质的定量。在这样的样品中可以通过下面的方法解出蛋白质的浓度，分别测定 260nm 和 280nm 的吸收值，如下计算蛋白质的浓度：蛋白质浓度（mg/ml）$=1.55 \times A_{280} - 0.76 \times A_{260}$。

只有在核酸浓度小于 20%（w/v）或 $A_{280}/A_{260} < 0.6$ 时才可以用该方法估计蛋白质浓度。

备择方案　用 A_{205} 测定蛋白质的浓度

通过测量在 205nm 处的吸收值（A_{205}）测定蛋白质浓度是基于肽键在 205nm 处有吸收（a_{205}）。该法可用于定量浓度为 1～100μg/ml 的蛋白质溶液。

补充材料（同见基本方案 1）

Brij 35 溶液：0.01%（v/v）Brij 35（Sigma）水溶液，适于溶解或稀释样品蛋白质

1. 用 Brij 35 溶液溶解或稀释蛋白质样品。
2. 打开分光光度计的 UV 灯，波长设置为 205nm。测量前机器需预热 30min。用 Brij 35 溶液调零。
3. 测量蛋白质样品的吸收值。

4a. 如果已知蛋白质的 a_{205}：将它的吸收值代入方程 A.3A.1 计算未知样品浓度，不同的是用 A_{205} 和 a_{205} 代入。

4b. 如果不知道蛋白质的 a_{205}：将它的吸收值代入方程 A.3A.5 来估算蛋白质样品浓度。在该方程中，吸收值 31 的单位是 ml/（mg·cm），b 是光路长度，其单位是 cm。

$$\text{浓度 (mg/ml)} = \frac{A_{205}}{31 \times b}$$

方程 A.3A.5

基本方案 2　用荧光发射测量蛋白质浓度

蛋白质浓度也可以通过测定内部荧光（基于芳香族氨基酸色氨酸、酪氨酸和/或苯丙氨酸可以发射荧光，见表 A. 3A. 4）来测量。该测量方法用于测定浓度为 5～50μg/ml 的蛋白质溶液。

表 A. 3A. 4　芳香族氨基酸的荧光发射特性[a]

氨基酸	激发波长/nm	发射波长/nm	获得量子
苯丙氨酸	260	283	0.04
色氨酸	285	360	0.20
酪氨酸	275	310	0.21

a. 数值适用于 25℃，pH7.0 的水溶液（Hawkins and Honigs，1987；Fasman，1989）。

材料（带√项见附录 1）

√ 用纯化的蛋白质作为标准蛋白溶液
　样品蛋白质
　分光荧光计或过滤荧光计（带有激发光截断滤片≤285nm，发射滤片＞320nm）

1. 用与样品相同的溶剂稀释纯化蛋白制备稀释液：5、7.5、10、25 和 50μg/ml。空白对照仅含溶剂。
2. 测量前 30min 打开仪器光源使预热。用空白溶剂调零。

　如果使用分光荧光计，设置激发波长为 280nm，发射波长为 320～350nm。如果不知道确切的发射波长，根据经验扫描标准溶液（激发波长定为 280nm）来确定。如果使用过滤荧光计，则采用激发截断滤片≤285nm，发射滤片＞320nm。
3. 测量蛋白质标准和样品溶液的发射荧光。
4. 通过对荧光密度-标准品浓度作图或回归分析建立校正曲线。用样品蛋白质的荧光密度从校正曲线上得到浓度。

参考文献：Chen，1990；Fasman，1989；Stoscheck，1990
撰稿人：Michael H. Simonian

3B　比色法检测和定量总蛋白

蛋白质定量对于分离和定性研究中的处理蛋白质样品而言是很重要的步骤，是蛋白质进行色谱、电泳或免疫化学分析和分离之前的一个必要步骤。蛋白质检测方法的选择基于方法的灵敏度和精确度，另外还有待测样品的情况。

策略性计划　比色法蛋白质分析

目的是为了选择一个方法，因为一些干扰物质的存在，所以需要最少的操作或对样品的预处理。如果样品中总蛋白浓度较高（即在5～160mg/ml范围内），那么双缩脲总蛋白试剂是最佳选择。如果样品中总蛋白浓度较低（即在1～2000μg/ml），那么其他三种的任一种都可能合适。如果样品中含有还原试剂或铜离子螯合试剂，Coomassie Plus Protein Assay Reagent（Pierce）将是最好的选择。如果样品中含有一种或多种去垢剂（浓度等于5%），BCA Protein Assay Reagent为最佳选择。

有时候样品中所含物质不适于用任何一种测量方法（见表A.3B.1）。在这些情况下，则需要对样品进行一些预处理。

表A.3B.1　92种物质的最大适合浓度[a]

受试物质	BCA法	考马斯加法	改良Lowry法
去垢剂			
Brij 35	5.0%	0.062%	0.031%
Brij 56	1.0%	0.031%	0.062%
Brij 58	1.0%	0.016%	0.062%
CHAPS	5.0%	5.0%	0.062%
CHAPSO	5.0%	5.0%	0.031%
脱氧胆酸	5.0%	0.04%	未测
Lubrol PX	1.0%	0.031%	0.031%
Nonidet P-40	5.0%	0.5%	0.016%
辛基糖苷	5.0%	0.5%	0.031%
辛基β硫代糖苷	5.0%	3.0%	未测
SDS(十二醇)	5.0%	0.016%	1.0%
SPAN 20	1.0%	0.5%	0.25%
Triton X-100	5.0%	0.062%	0.031%
Triton X-114	1.0%	0.062%	0.031%
Triton X-305	1.0%	0.125%	0.031%
Triton X-405	1.0%	0.25%	0.031%
Tween 20	5.0%	0.031%	0.062%
Tween 60	5.0%	0.025%	未测
Tween 80	5.0%	0.016%	0.031%
Zwittergent 3-14	1.0%	0.025%	未测
盐和缓冲液			
ACES, pH7.8	25mmol/L	100 mmol/L	未测
硫酸铵	1.5 mol/L	1mol/L	不适用

续表

受试物质	BCA法	考马斯加法	改良 Lowry 法
天冬酰胺	1 mmol/L	10 mmol/L	5 mmol/L
N-二(羟乙基)甘氨酸，pH8.4	20 mmol/L	100 mmol/L	未测
Bis-Tris，pH 6.5	33 mmol/L	100 mmol/L	未测
硼酸盐(50mmol/L)，pH8.5(BupH pack)	未稀释	未稀释	未测
B-PER 细胞裂解试剂	未稀释	1∶2 稀释	未测
$CaCl_2$ TBS 溶液	10 mmol/L	10 mmol/L	未测
碳酸钠/碳酸氢钠(0.2mol/L)，pH9.4	未稀释	未稀释	未测
碳酸氢铯	100 mmol/L	100 mmol/L	50 mmol/L
CHES，pH9.0	100 mmol/L	100 mmol/L	未测
$CoCl_2$ TBS 溶液	0.8 mmol/L	10 mmol/L	未测
EPPS，pH8.0	100 mmol/L	100 mmol/L	未测
$FeCl_3$ TBS 溶液	10 mmol/L	10 mmol/L	未测
甘氨酸	1 mmol/L	100 mmol/L	100mmol/L
HEPES	100mmol/L	100 mmol/L	1 mmol/L
咪唑，pH10.2	50 mmol/L	200 mmol/L	25 mmol/L
MES，pH6.1	100 mmol/L	100 mmol/L	100 mmol/L
0.1mol/L MES/0.9%NaCl，pH4.7	未稀释	未稀释	未测
MOPS，pH7.2	100 mmol/L	100 mmol/L	未测
改良的 Dulbecco's PBS	未稀释	未稀释	未测
$NiCl_2$ TBS 溶液	10 mmol/L	10 mmol/L	未测
磷酸缓冲液(PBS)，pH7.2	未稀释	未稀释	未测
PIPES，pH6.8	100 mmol/L	100 mmol/L	未测
RIPA 裂解缓冲液，pH8.0	未稀释	1∶40 稀释	未测
醋酸钠	200 mmol/L	180 mmol/L	200 mmol/L
叠氮钠	0.2%	0.5%	0.2%
碳酸氢钠	100 mmol/L	100 mmol/L	100 mmol/L
NaCl	1.0mol/L	1mol/L	1mol/L
柠檬酸钠，pH4.8	200 mmol/L	200 mmol/L	未测
磷酸钠	100 mmol/L	100 mmol/L	100 mmol/L
Tricine，pH8.0	25 mmol/L	100 mmol/L	未测
三乙醇胺，pH7.8	25 mmol/L	100 mmol/L	未测
Tris	250 mmol/L	2mol/L	10 mmol/L
TBS，pH7.6	未稀释	未稀释	未测
25mmol/L Tris/192mmol/L 甘氨酸，pH8.0	1∶3 稀释	未稀释	未测
25mmol/L Tris/192mmol/L 甘氨酸/0.1% SDS，pH8.0	未稀释	1∶4 稀释	未测
$ZnCl_2$ TBS 溶液	10 mmol/L	10 mmol/L	未测

续表

受试物质	BCA 法	考马斯加法	改良 Lowry 法
还原剂			
N-乙酰葡糖胺 PBS 溶液	10 mmol/L	100 mmol/L	未测
抗坏血酸	不适合	50 mmol/L	1 mmol/L
儿茶酚胺	不适合	未测	未测
肌氨酸	不适合	未测	未测
葡萄糖	10mmol/L	1mol/L	0.1 mmol/L
蜜二糖	不适合	—	—
硫氰酸钾	3mol/L	—	—
含硫试剂			
半胱氨酸	不适合	10 mmol/L	1 mmol/L
二硫赤藓糖醇(DTE)	1mmol/L	1 mmol/L	不适合
二硫苏糖醇(DTT)	1 mmol/L	5 mmol/L	不适合
2-巯基乙醇	0.01%	1mol/L	1 mmol/L
硫柳汞	0.01%	0.01%	0.01%
螯合剂			
EDTA	10mmol/L	100 mmol/L	1 mmol/L
EGTA	不适合	2 mmol/L	1 mmol/L
柠檬酸钠,pH4.8	200 mmol/L	200 mmol/L	0.1 mmol/L
溶剂/混合物			
丙酮	10%	10%	10%
乙腈	10%	10%	10%
抑肽酶	10 mg/L	10 mg/L	10 mg/L
DMF	10%	10%	10%
DMSO	10%	10%	10%
乙醇	10%	10%	10%
甘油(新鲜)	10%	10%	10%
盐酸胍	4mol/L	3.5mol/L	100 mmol/L
盐酸	100 mmol/L	100 mmol/L	100 mmol/L
Leupeptin	10 mg/L	10 mg/L	10 mg/L
甲醇	10%	10%	10%
酚红	不适合	0.5 mg/L	0.1 mg/L
PMSF	1 mmol/L	1 mmol/L	1 mmol/L
NaOH	100 mmol/L	100 mmol/L	100mmol/L
蔗糖	40%	10%	7.5%
TLCK	0.1mg/L	0.1mg/L	0.01mg/L
TPCK	0.1mg/L	0.1mg/L	0.1mg/L
尿素	3mol/L	3mol/L	3mol/L
O-钒酸盐 PBS 溶液	1 mmol/L	1 mmol/L	未测

a. 摘自蛋白质分析技术手册,Pierce Chemical,1999。

蛋白质标准品的选择

蛋白质标准品的选择是任何一种蛋白质分析中潜在的最大误差源。当然，标准品的最佳选择是样品中含量最多的蛋白质的高纯度形式。另一种选择是采用在所选蛋白质分析方法中颜色反应曲线非常相似的蛋白质（例如，BSA 或牛丙种球蛋白）。

为了使未知样品中总蛋白的浓度测定精确性最高，每次测定都需要作标准曲线，特别是那些会产生非线性标准曲线的蛋白质分析方法（例如，Lowry 法，考马斯染料结合法）。对于在试管中进行的测定而言，有两个重复样品就足够了；但是，如果测定是在微量滴定板中进行的话，推荐使用三个重复样品，因为微量滴定板及其读数仪增大了引入误差。

样品准备

样品在用于分析总蛋白浓度前，它必须先溶解，通常使用冷缓冲水溶液，其中含有一种或多种表面活性剂、一种或多种生物杀灭剂以及蛋白酶抑制剂。过滤或离心（去除细胞碎片）后，可能还需要一些补充步骤，如过滤灭菌、除脂或从其他样品组分中进一步纯化目的蛋白。

结果计算

如果是手工计算蛋白质浓度，最好采用点对点插补。如果标准曲线是非线性的，这么做尤其正确。如果用计算机计算，采用适合于非线性标准曲线的二次曲线来计算样品蛋白质的浓度。

基本方案 1　Lowry 蛋白质分析法用于测定总蛋白

反应见图 A. 3B. 1

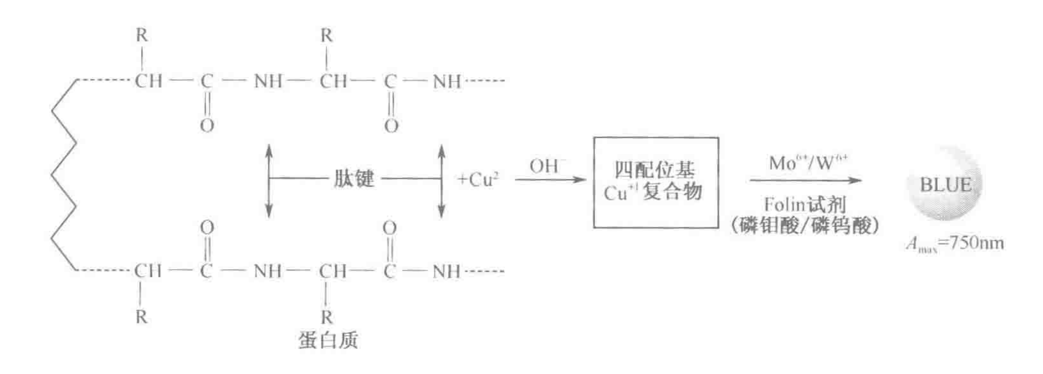


图 A. 3B. 1　Lowry 蛋白质分析法的反应示意图

材料（带√项见附录 1）

√ 标准品蛋白：2mg/ml BSA

样品缓冲液或溶剂

样品蛋白质

√ Lowry 试剂 C 和 D 或 D′

1. 将 0～100μl 标准品蛋白加入到各个作有标记的试管中，用样品缓冲液或溶剂稀释到 100μl 来制备 10～100μg 的梯度。

   该浓度范围内的白蛋白在 1cm 小杯中 A_{750} 读数范围约为 0.10～1.0AU。

2. 将≤100μl 的蛋白质样品分配到各个标记的双份试管中，用准备标准品相同的缓冲液或溶剂调节终体积至 100μl。
3. 每个标准品和未知样品中加入 1ml 试剂 D（或试剂 D′）。立即蜗旋试管以产生最佳的颜色。室温下孵育 10min（精确定时）。
4. 一边混匀，一边加入 0.1ml 试剂 C。立即蜗旋试管。室温孵育 30min。
5. 用分光光度计测量 750nm 处吸收值（A_{750}），测定之前 10～60min 内仪器先用去离子水调零。
6. 标准曲线是用每个标准品纯的或空白校正过的 A_{750} 平均值对它们的蛋白质浓度（mg/ml）作图。用内插法从标准曲线上得到样品蛋白质的浓度。

备择方案 1　改良 Lowry 蛋白质分析法用于测定总蛋白

补充材料（同见基本方案 1）

改良的 Lowry 蛋白质分析试剂盒（Pierce）包含：

2mg/ml BSA，溶于 0.9%（w/v）NaCl/0.05%（w/v）NaN_3

2mol/L Folin-Ciocalteu 试剂：新鲜配制为 1mol/L

改良的 Lowry 试剂

1. 将 2mg/ml 的 BSA（如改良的 Lowry 蛋白质分析试剂盒提供的标准品）用缓冲液稀释成一系列梯度，浓度覆盖 2.0～1500μg/ml。
2. 每个都有一个重复测量，将 200μl 稀释的标准品、样品或缓冲液（空白）加入到正确标记的试管中。
3. 以 15s 为间隙，每管加入 1.0ml 改良的 Lowry 蛋白质分析试剂。蜗旋 2～3s 以混匀试管内的各成分，室温孵育 10min（精确计时）。
4. 当第一支试管的 10min 孵育结束时，加入 100μl 新鲜稀释的 Folin-Ciocalteu 试剂（使用前从 2mol/L 储备液稀释）。立即蜗旋试管 2～3s。向其他试管中加试剂时，仍然保持步骤 3 中的 15s 间隔。让所有试管在室温下孵育 30min。
5. 用分光光度计测量 750nm 处吸收值（A_{750}），测定之前仪器用去离子水调零。
6. 标准曲线是用每个 BSA 标准品纯的或空白校正过的 A_{750} 平均值对它们的蛋白质浓度（μg/ml）作图。用内插法从标准曲线上得到样品蛋白质的浓度。用每个样品两个重复测量的平均值得到它们的平均总蛋白浓度。

表 A.3B.2 是该技术简要的故障解决指南。

表 A.3B.2　改良的 Lowry 蛋白质分析的故障解决指南

问　题	可能原因	解决方法
任何试管都没有颜色	样品中含有螯合剂（如 EDTA，EGTA）	透析或稀释样品 用 TCA 沉淀蛋白质，将沉淀溶解在改良 Lowry 试剂中
空白(A_{750})为正常，但标准品的颜色比预期的浅	样品改变了试剂的 pH 用错误的波长测量颜色	透析或稀释样品 在 750nm 测量颜色
所有试管中都有沉淀	样品中含有表面活性剂(去垢剂) 样品中含有 K^+	透析或稀释样品 用 TCA 沉淀蛋白质，将沉淀溶解在改良 Lowry 试剂中
所有试管(包括空白)都呈现暗紫色	样品含有还原剂 样品含有硫醇	透析或稀释样品 用 TCA 沉淀蛋白质，将沉淀溶解在改良 Lowry 试剂中
需要在不同的波长才能读出颜色	比色计没有 750nm 滤片	可以用 650～750nm 中的任意波长读出颜色

备择方案 2　改良的微量滴定板 Lowry 分析法用于测定总蛋白

改良的 Lowry 分析法也可以以 96 孔微量滴定板模式进行。该法的工作范围为 1～1500 μg/ml。

补充材料（同见基本方案 1）

微量滴定板和盖子或黏胶封口纸
200μl 多通道微量加样器
750nm 微量滴定板读数仪

1. 画一张草图设计样品和标准品（3 个重复孔）在微量滴定板上的位置。
2. 取稀释的 BSA 标准品（见备择方案 1，步骤 1）、样品或稀释液（空白）40μl 加入 96 孔板的正确位置。
3. 用多通道微量加样器快速地将 200μl 改良的 Lowry 蛋白质分析试剂加入到每个孔中。立即在 96 孔板混匀器上混 30s。室温孵育 10min（精确定时）。
4. 用多通道微量加样器快速地将 20μl 新鲜稀释的 1mol/L Folin-Ciocalteu 试剂加入到每个孔中。立即在 96 孔板混匀器上混 30s。盖住平板（以防蒸发），室温孵育 30min。
5. 再次混匀平板，用微量滴定板读数仪测定 750nm 的每孔颜色（吸收值）。

6. 标准曲线是用每个标准品纯的或空白校正过的 A_{750} 平均值对它们的蛋白质浓度（μg/ml）作图。用内插法从标准曲线上得到样品蛋白质的浓度。用每个样品三个重复测量的平均值得到它们的平均总蛋白浓度。

基本方案 2　二喹啉甲酸（BCA）蛋白质分析法用于测定总蛋白

该方法中的紫色产物是由两分子 BCA 和一个铜离子螯合而成的（图 A.3B.2）。BCA/铜复合物是水溶性的，在 562nm 出的光吸收与蛋白质浓度呈很强的线性关系。BCA 蛋白质分析试剂的最主要的优势是大多数表面活性剂，即使在样品中的浓度达到 5%（v/v）也可以使用该法。

步骤1：蛋白质+Cu^{2+} $\xrightarrow{OH^-}$ Cu^{+}

步骤2：Cu^{+} +2BCA ⟶ BCACu 复合物

图 A.3B.2　BCA 蛋白质分析的反应示意图

材料（带√项见附录 1）

√ 标准品蛋白：2mg/ml BSA
　样品缓冲液或溶剂
　样品蛋白质
　BCA 工作试剂：BCA 试剂 A 和试剂 B 按 50∶1 混匀（见每种试剂的配方）

1. 用样品缓冲液或稀释液将 2mg/ml BSA 稀释为一系列浓度为 125～2000μg/ml 的标准品溶液。
2. 将 100μl 样品、稀释的标准品或缓冲液（空白）加入到正确标记的双份试管中。
3. 每个试管中加入 2ml BCA 工作试剂。立即涡旋试管。37℃孵育样品和标准品 30min，然后冷却到室温。
4. 用分光光度计测量 562nm 处吸收值（A_{562}），测定前仪器用去离子水调零。
5. 标准曲线是用每个标准品纯的或空白校正过的 A_{562} 平均值对它们的蛋白质浓度（μg/ml）作图。用内插法从标准曲线上得到样品蛋白质的浓度。

表 A.3B.3 是该技术简要的故障解决指南。

表 A.3B.3　BCA 蛋白质分析的故障解决指南

问　题	可能原因	解决方法
任何试管都没有颜色	样品中含有铜离子螯合剂	透析或稀释样品 提高工作试剂中的铜离子浓度（试剂 A 与试剂 B 按 48∶2 混合）
空白 A_{562} 为正常，但标准品和样品的颜色比预期浅	强酸或强碱缓冲液，改变了工作试剂的 pH 用错误的波长测量颜色	透析或稀释样品 在 562nm 处测量颜色
样品的颜色比预期深	蛋白质浓度太高 样品含有脂类或脂蛋白	稀释样品 样品中加入 2%（w/v）SDS 以消除脂类的干扰
所有试管（包括空白）都呈现暗紫色	样品含有还原剂 样品含有硫醇	透析或稀释样品 用 TCA 和脱氧胆酸（DOC）沉淀蛋白质，将沉淀溶解在 BCA 工作试剂中
	样品含有生物胺（儿茶酚胺）	用碘代乙酰胺（用于硫醇类）处理样品
需要在不同的波长才能读出颜色	比色计没有 750nm 滤片	可以用 650～750nm 中的任意波长读出颜色

备择方案 3　试剂盒用于总蛋白的 BCA 测量

补充材料（同见基本方案 2；带√项见附录 1）

BCA 蛋白质分析试剂盒（Pierce）或二喹啉甲酸试剂盒（Sigma）含有：

√ 2mg/ml BSA，溶于 0.9% NaCl/0.05% NaN_3

√ BCA 试剂 A

√ BCA 试剂 B

37℃水浴

1. 用缓冲液将 BSA 稀释为一系列浓度为 125～2000μg/ml 的标准品溶液。
2. 制备足量的 BCA 工作试剂（最少 2ml/试管），配制方法是：BCA 试剂 B 和 BCA 试剂 A 以 2∶100 混合。
3. 将 100μl 标准品、样品或缓冲液（空白）加入到正确标记的双份试管中。每个试管中加入 2ml BCA 工作试剂。每个试管涡旋 2～3s 混匀。

4a. 标准试管方案：37℃水浴中孵育 30min。

4b. 增强型分析方案：可选择的做法是，将所有试管在 60℃水浴中孵育 30min。

5. 孵育后，所有试管冷却到室温。
6. 测量前再次混合每个试管，10min 内用分光光度计测量每个试管在 562nm 处相对于去离子水的吸收值（A_{562}）。

7. 标准曲线是用每个标准品纯的或空白校正过的 A_{750} 平均值对它们的蛋白质浓度（μg/ml）作图。用内插法从标准曲线上确定样品蛋白质的浓度。有三个重复样品的浓度算出平均值。

备择方案 4　微量滴定板分析用于总蛋白的 BCA 测量

补充材料（同见备择方案 2）

96 孔微量滴定板和盖子或黏胶封口纸
200μl 多通道微量加样器
微量滴定板振荡器
37℃干热培养箱
微量滴定板读数仪

1. 画一张草图设计样品和标准品（三个重复孔）在微量滴定板上的位置。
2. 取稀释的 BSA 标准品（见备择方案 3，步骤 1）、样品或稀释液（空白）10μl 加入正确的三个重复孔。
3. 用多通道微量加样器快速地将 200μl BCA 工作试剂（见备择方案 3，步骤 2）加入到每个孔中。在微量滴定板振荡器上 30s 充分混匀。盖住平板，在 37℃干热培养箱内孵育 30min。
4. 孵育后，使平板冷却至室温。
5. 再次混匀平板，除去板盖，用微量滴定板读数仪测定每个孔在 562nm 处的颜色（吸收值）。
6. 标准曲线是用每个标准品纯的或空白校正过的 A_{562} 平均值对它们的蛋白质浓度（μg/ml）作图。用内插法从标准曲线上得到样品蛋白质的浓度。用每个样品三个重复测量的平均值得到它们的平均总蛋白浓度。

尿素（过量）　180℃　Biuret　Cu^{2+}　铜复合物

图 A. 3B. 3　双缩脲反应的示意图

基本方案 3 双缩脲分析用于测量总蛋白

在称之为双缩脲反应的反应中，在碱性硫酸铜溶液存在的情况下，铜离子与肽键形成了有色螯合复合物（图 A.3B.3）。所产生的颜色密度与参与反应肽键数成比例。对于血清总蛋白的双缩脲反应而言，已知胆红素、脂类、血红蛋白和葡聚糖具有干扰作用。其他的铜离子螯合剂也会干扰反应，如 EDTA、EGTA、柠檬酸盐、Tris、亚氨基二乙酸和三乙酸基氨。

材料（带√项见附录 1）

标准品蛋白质

样品（未知）蛋白质

√ 双缩脲总蛋白试剂（Sigma Diagnostics）

1. 选择一个蛋白质作为标准品，用缓冲液将标准品稀释为覆盖 10～160mg/ml 的一系列稀释液。
2. 将 20μl 标准品、样品或稀释液（空白）加入到正确标记的双份试管中。每个试管中加入 1.0ml 双缩脲试剂。涡旋 2～3s 充分混匀。室温（18～26℃）孵育 10min。
3. 用分光光度计测量每个试管在 540nm 处相对于空白的吸收值（A_{540}）。

表 A.3B.4 双缩脲蛋白质分析故障解决指南

问　题	可能原因	解决方法
任何试管都没有颜色	样品中含有铜离子螯合剂	透析或稀释样品
空白 A_{540} 为正常，但标准品的颜色比预期的浅	用错误的波长测量颜色	在 540nm 测量颜色
所有试管(包括空白)都呈现暗紫色	样品含有还原剂	透析或稀释样品

4. 标准曲线是用标准品空白校正过的 A_{540} 值对它们的蛋白质浓度（mg/ml）作图。用内插法从标准曲线上得到样品浓度。

   表 A.3B.4 是该技术简要的故障解决指南。

备择方案 5 微量滴定板用于总蛋白的双缩脲分析

补充材料（同见基本方案 3）

96 孔微量滴定板和盖子或黏胶封口纸

250μl 多通道微量加样器和适合的加样头

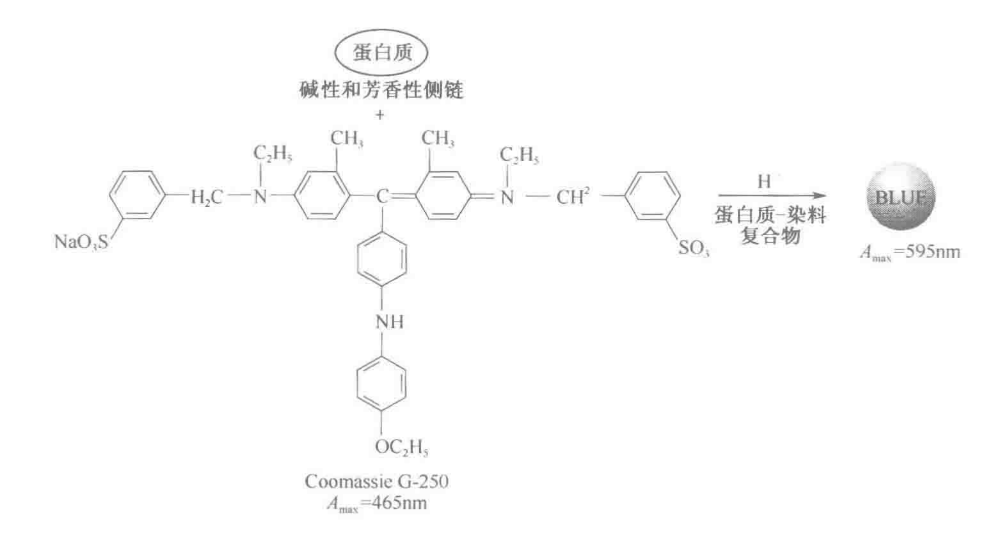
微量滴定板振荡器

微量滴定板读数仪

1. 画一张草图设计样品和标准品（3个重复孔）在微量滴定板上的位置。
2. 选择一个蛋白质作为标准品。用与稀释样品相同的缓冲液将标准品稀释为覆盖10～160mg/ml的一系列稀释液。
3. 将每个稀释好的5.0μl标准品或样品（3个重复孔）加入到确切的微量滴定板孔中。用于稀释标准品和样品的缓冲液或稀释液加入空白孔。
4. 用多通道微量加样器向每个孔中加入250μl双缩脲试剂。在微量滴定板振荡器上振30s充分混匀。盖住平板，室温孵育10min。
5. 再次混匀。除去板盖，用微量滴定板读数仪测定每个孔在540nm处的颜色（A_{540}）。
6. 标准曲线是用每个标准品纯的或空白校正过的A_{540}平均值对它们的蛋白质浓度(mg/ml)作图。用内插法从标准曲线上得到样品蛋白质的浓度。

基本方案4　考马斯染料结合（Bradford）分析用于总蛋白测量

考马斯染料（Bradford）蛋白质分析试剂（图A.3B.4）的优势是，对蛋白质样品中可能存在的大多数盐、溶剂、缓冲液、硫醇、还原性物质和金属螯合剂均不排斥。



图A.3B.4　考马斯蛋白质分析的反应示意图

材料（带√项见附录1）

样品缓冲液或溶剂
√ 蛋白质标准品（如2mg/ml BSA）
蛋白质样品
√ 考马斯染料试剂（Pierce或Bio-Rad）

1. 用蛋白质标准品（如2mg/ml BSA）和样品缓冲液制备一系列稀释液，使浓度覆盖100～1000μg/ml。

BSA 的普通染料结合能力比大多数蛋白质强。

2. 将 0.1ml 标准品、样品或缓冲液加入到正确标记的双份试管中。加入 5ml 考马斯染料试剂。立即涡旋。室温孵育 10min。
3. 在测量 595nm 吸收值（A_{595}）前涡旋每个试管。
4. 标准曲线是用每个标准品纯的或空白校正过的 A_{595} 平均值对它们的蛋白质浓度（μg/ml）作图。用内插法从标准曲线上得到样品浓度。

备择方案 6　考马斯加蛋白质分析用于总蛋白测量

补充材料（同见基本方案 4）

考马斯加蛋白质分析试剂盒（Pierce），含有考马斯加蛋白质分析试剂
聚苯乙烯小杯

1. 用 2mg/ml BSA 和样品缓冲液制备一系列稀释液，使浓度覆盖 100～2000μg/ml。
2. 将考马斯加蛋白质分析试剂移至室温下。用前轻轻颠倒混匀分析试剂。
3. 将 50μl 标准品、样品或稀释液（空白）加入到正确标记的双份试管中。加入 1.5ml 考马斯加蛋白质分析试剂。涡旋 2～3s 充分混匀。室温孵育 10min。

表 A.3B.5　考马斯加蛋白质分析的故障解决指南

问　题	可能原因	解决方法
空白 A_{595} 为正常，但标准品的颜色比预期浅	试剂储存不当 试剂依然温度较低 用错误的波长测量颜色	将试剂存放在冰箱内 用之前预热到室温 在 595nm 处测量颜色
空白和标准品正常，但样品的颜色浅	低分子质量样品蛋白质（<300kDa）	采用 BCA（见基本方案 2）或 Lowry 蛋白质分析（见基本方案 1）
管中出现沉淀形式	样品中含有表面活性剂（去垢剂）	透析或稀释样品 用 TCA 沉淀蛋白质，将沉淀溶于 50mmol/L NaOH 中
所有试管（包括空白）都呈现暗蓝色	强碱性缓冲液或试剂升高了试剂的 pH 样品体积太大，试剂 pH 升高	透析或稀释样品 样品和试剂最大以 1∶1 混合
需要在不同的波长才能读出颜色	比色计没有 595nm 滤片	可以用 575～615nm 中的任意波长读出颜色

4. 测量前再次混匀试管。在聚苯乙烯小杯中测量 595nm 处的吸收值（A_{595}）。
5. 标准曲线是用每个标准品纯的或空白校正过的 A_{595} 平均值对它们的蛋白质浓度（μg/ml）作图。用内插法从标准曲线上得到样品浓度。用每个样品两个重复测量的平均值算出它们的平均总蛋白浓度。

表 A.3B.5 是该方法简要的故障解决指南。

备择方案 7 微量滴定板用于考马斯分析总蛋白

微量滴定板分析的工作范围是 1～25μg/ml。

补充材料（同见基本方案 4）

考马斯加蛋白质分析试剂盒（Pierce），含有考马斯加蛋白质分析试剂
96 孔微量滴定板
300μl 多通道微量加样器
微量滴定板振荡器
微量滴定板读数仪

1. 将考马斯加蛋白质分析试剂移至室温下。轻轻颠倒瓶子混匀试剂。
2. 画一张草图设计样品和标准品（3 个重复孔）在 96 孔微量滴定板上的位置。
3. 将每个稀释好的 10μl BSA 标准品、样品或稀释液（空白）加入到 96 孔微量滴定板确切的孔中（三个重复孔）。用多通道微量加样器向每个孔中加入 300μl 考马斯加蛋白质分析试剂。在平板振荡器上振 30s 充分混匀。室温孵育 10min。
4. 读数前再次混匀。然后在平板读数仪上测定 595nm 处的吸收值（A_{595}）。
5. 标准曲线是用每个标准品纯的或空白校正过的 A_{595} 平均值对它们的蛋白质浓度（μg/ml）作图。用内插法从标准曲线上得到样品蛋白质的浓度。用每个样品的三个重复测量值算出它们的平均总蛋白浓度。

互联网资源

http://www.piercenet.com
http://www.sigma-aldrich.com

参考文献：Akins and Tuan，1992；Beyer，1985；Brown et al，1989；Compton and Jones，1985；Crowley，1969；Peterson，1977，1979；Sorenson and Brodbeck，1986；Tal et al，1980；Waters，1978；Weichselbaum，1946；Wiechelman et al，1988
撰稿人：Randall I. Krohn

3C 蛋白质溶液的透析和浓缩

透析

传统的透析是通过仅允许小分子穿过选择性半透膜的方法将大分子和小分子分离开。透析通常用于改变含有大分子溶液中的盐（小分子）组成。然而，在小分子溶质穿过膜运动的同时，溶剂也在向相反的方向运动。这就导致了一些样品的稀释（通常

<50%)。

基本方案1　大体积透析

该方案描述透析易处理的大体积样品（通常是0.1～500ml）时膜的使用。

材料

透析膜（见支持方案）
夹子（Spectra/Por Closures，Spectra或同等产品）
待透析含大分子的样品
适当的透析缓冲液

1. 从乙醇储存液中取出透析膜，用蒸馏水淋洗。用夹子将膜的一端牢牢固定，或者在一端打上双结。
2. 将膜内注入水或缓冲液，抓紧并封闭未夹住的一端，挤压膜。如果出现有细小的水柱向外喷射，则说明该膜上存在细微的漏洞；弃之而尝试新膜。
3. 倒掉透析膜中的水或缓冲液，以大分子样品代替，用夹子夹住开口端，并留有一定空间以备体积的增大。再次挤压以检测膜和夹子的完整性。
4. 将透析膜浸没在装有大体积（相对于样品）预期缓冲液的烧杯或烧瓶中。在预期温度下轻轻搅拌缓冲液，透析至少3h。更换透析液2～3次，或由需要决定。
5. 从缓冲液中取出透析膜。垂直持膜，去除顶端夹子外嵌在膜端部的多余缓冲液。释放顶部夹子，用巴斯德吸管取出样品。

备择方案　小体积透析

该法用于溶液体积小于100μl的情况。

补充材料（同见基本方案1）

0.5ml微型离心管或1.5ml微型离心管（用于稍大的体积）
巴斯德吸管
钻孔器

1. 用烧热的玻璃巴斯德吸管（宽口烧热）或钻孔器刺破每个微型离心管盖以彻底去除盖子的中央部分（见图A.3C.1）。打开盖子，在管的顶部按管的形状放置一层透析膜。加入样品（10～500μl；0.1～10mg/ml蛋白质），然后盖上盖子使透析膜盖在原位。
2. 颠倒管子，振荡使反应混合物处于膜表面。将每个管子粘在烧杯的一面上，透析表面向下，然后向烧杯内注入PBS或所选缓冲液。4℃搅拌透析2h。
3. 回收样品时，从缓冲液中取出微型离心管并作正向短暂地离心。

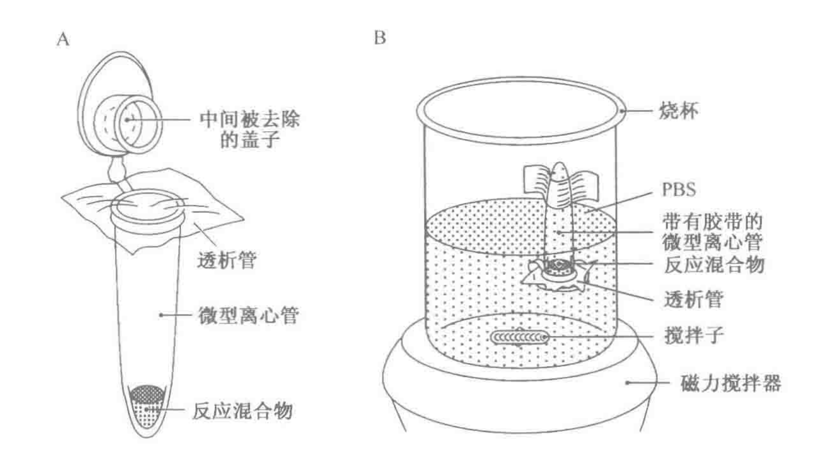


图 A.3C.1 制作微型透析室

(A) 用烧热的巴斯德吸管（宽口）去除微型离心管盖的中央部分。将待透析的反应混合物加入管中。将一块预先软化的透析膜松散的盖在管上。盖上盖子。(B) 颠倒管子，振荡使样品处于透析膜上（或倒转管子离心，如果样品很少的话），将管子粘在充满缓冲液的烧杯中。检查膜下面没有气泡

支持方案 透析膜的选择和制备

透析膜有多种厚度和孔径。厚膜更结实，但是限制了溶质流动；因此达到平衡更慢。对于大多数质粒和蛋白质的透析，MWCO 12 000～14 000 比较合适，而 MWCO 3500 2000 或甚至 1000 比较适合于肽段。

材料

透析膜（如 Spectrum）
10mmol/L 碳酸氢钠
10mmol/L Na_2EDTA，pH8.0
20%～50%（v/v）乙醇

1. 从卷轴中取出膜，剪下所用的长度（通常 8～12in.）。
   在处理透析膜时一定要戴手套，因为它容易被一些分解纤维素的微生物破坏。
2. 将膜浸湿，在大体积 10mmol/L 碳酸氢钠中煮沸数分钟。
3. 在 10mmol/L Na_2EDTA 中煮沸数分钟。重复。
4. 用蒸馏水洗涤数次。
5. 储存在 4℃，20%～50%（v/v）乙醇中以防止分解纤维素的微生物生长。

溶液的浓缩

因为通常抗体或其他蛋白质浓度＞1mg/ml 时储存更方便，所以有必要浓缩溶液。另外，为了减小样品体积蛋白质溶液的浓缩也常常是必要的。

浓缩蛋白质溶液有几种简单和相对廉价的方法。可以采用对 Aquacide 11A (Calbiochem) 透析的方法，它可以将水通过透析管除去。浓缩后，溶液需要重新透析于合适的缓冲液中。另一种方法是使用 Immersible-CX Ultrafilters (Millipore)，当与真空装置相连时，它可以除去小于分子量截值 (MWCO) 的任何东西。

另外，也可以采用离心浓缩仪，它可以在常规实验室离心机的辅助下工作。Centricon 微型浓缩仪 (Amicon)，它具有不同的 MWCO 值，对于浓缩小体积的少量材料非常有用。当使用这些装置的时候，按照生产商提供的说明书进行操作。Centriprep 离心过滤装置 (Millipore) 是一次性超滤装置，用于对 2～15ml 体积范围内的生物样品进行纯化、浓缩和除盐；它们的设计使之可以在大多数具有 50ml 离心管的离心机上使用。这些装置及其使用说明书的进一步描述可以在以下的网站上找到：http://www.millipore.com。

参考文献：Craig，1967；McPhie，1971

撰稿人：Sarah M. Andrew，Julie A. Titus and Louis Zumstein

3D 用吸收和荧光光谱学定量 DNA 和 RNA

这三项操作的工作范围从 5～10ng/ml DNA 到 50μg/ml DNA（表 A.3D.1）。只要考虑到了污染物和缓冲液组分的作用，吸收测量是直截了当的方法。荧光分析比 A_{260} 测量更不容易受到干扰，操作也很简单。

表 A.3D.1 DNA 和 RNA 吸收和荧光分光光度分析的特性

特性	吸收(A_{260})	荧光[a]	
		H33258	EtBr
敏感性(μg/ml)			
DNA	1～50	0.01～15	0.1～10
RNA	1～40	N.A.	0.2～10
信号比值(DNA/RNA)	0.8	400	2.2

a. 缩写：EtBr，溴化乙锭；H33258，Hoechst 33258；N.A.，不可用。

基本方案 用吸收光谱学检测核酸

在数个不同的波长测量样品的吸收，以估计核酸的纯度和浓度。

材料（带√项见附录 1）

√ 1×TNE 缓冲液

待测 DNA 样品

√ 牛胸腺 DNA 标准溶液

匹配的半微量分光光度计石英杯（1cm 光长）

单光束或双光束分光光度计（从紫外到可见）

1. 将 1.0ml 1×TNE 缓冲液吸入石英杯中。放入单光束或双光束分光光度计中，在 325nm 处读数（微粒；如果必要请注意空白相对于蒸馏水的贡献），仪器调零。该空白溶液用作双光束仪器的参照。对于单光束分光光度计，取出空白杯，插入含有 DNA 样品或标准品（溶于空白相同的溶液）的石英杯。读数。在 280（蛋白质）、260（核酸）和 230nm（肽、酚和尿素）处重复该过程。
2. 用 A_{260} 读数代入下列方程即可得出 DNA 的浓度（C）：

单链 DNA：$C\ (\text{pmol}/\mu\text{l}) = \dfrac{A_{260}}{10 \times S}$　　$C\ (\mu\text{g/ml}) = \dfrac{A_{260}}{0.027}$

双链 DNA：$C\ (\text{pmol}/\mu\text{l}) = \dfrac{A_{260}}{13.2 \times S}$　　$C\ (\mu\text{g/ml}) = \dfrac{A_{260}}{0.020}$

单链 RNA：$C\ (\mu\text{g/ml}) = \dfrac{A_{260}}{0.025}$

寡核苷酸：$C\ (\text{pmol}/\mu\text{l}) = A_{260} \times \dfrac{100}{1.5N_A + 0.71N_C + 1.20N_G + 0.84N_T}$

其中，S 代表 DNA 大小（单位是 kb），N 是碱基（A、G、C 或 T）数。

这里使用的 ε 值分别是：ssDNA，0.027 $(\mu\text{g/ml})^{-1}\ \text{cm}^{-1}$；dsDNA，0.020 $(\mu\text{g/ml})^{-1}\text{cm}^{-1}$；ssRNA，0.025 $(\mu\text{g/ml})^{-1}\ \text{cm}^{-1}$。使用这种算法，$A_{260}$ 为 1.0 表示 50μg/ml 双链 DNA，～37μg/ml 单链 DNA，或者～40μg/ml 单链 RNA（摘自 Applied Biosystems，1989）。

对于寡核苷酸：浓度以更方便的单位 pmol/μl 来计算。寡核苷酸的碱基组成对吸收值的影响显著，因为总吸收值是每个碱基单体贡献的总和（表 A.3D.2）。

3. 用 A_{260}/A_{280} 比值和 A_{230} 和 A_{325} 处的读数来估计核酸样品的纯度。

比值在 1.8～1.9 和 1.9～2.0 分别显示 DNA 和 RNA 的纯度很高。

高纯度制备物在四个波长处的典型吸收值列于表 A.3D.3。

表 A.3D.2　DNA 碱基的摩尔消光系数[a]

碱基	$\varepsilon_{260\text{nm}}^{1\text{M}}$
腺嘌呤	15 200
胞嘧啶	7 050
鸟嘌呤	12 010
胸腺嘧啶	8 400

a. 在 260nm 处测量；见 Wallace 和 Miyada，1987。

表 A.3D.3　DNA 纯品的分光光度计测量[a]

波长/nm	吸收值	A_{260}/A_{280}	浓度/(μg/ml)
325	0.01	—	—
280	0.28	—	—
260	0.56	2.0	28
230	0.30	—	—

a. 溶于 1×TNE 缓冲液的高纯度牛胸腺 DNA 在 260nm 处典型的吸收值；DNA 浓度正常是 25μg/ml。

备择方案 1　用 DNA 结合荧光染料 Hoechst 33258 检测 DNA

Hoechst 33258 对于纳克级 DNA 很特异，而对 RNA 的亲和力很小，因此对于整个细胞的匀浆液和纯化的 DNA 都能适用。然而，荧光染料对 DNA 组成的改变敏感，倾向于结合在富含 AT 的区域。

补充材料（同见基本方案；带√项见附录 1）

√ Hoechst 33258 分析溶液（工作液）

专用的过滤荧光计（如 Amersham Pharmacia Biotech DQ1OO），激发波长 365nm，发射波长 460nm，或者扫描荧光分光光度计（例如，Shimadzu 的 RF-5000 型号或 Perkin-Elmer 的 LS-5B 或 LS-3B 型号）

荧光计正方形玻璃杯或一次性丙烯酸树脂杯（Sarstedt）

特氟纶搅拌棒

1. 准备扫描荧光分光光度计：设置激发波长为 365nm，发射波长为 460nm，或者打开专用的过滤荧光计。
2. 将 2.0ml Hoechst 33258 分析溶液吸入小杯，放入样品室。不含 DNA 时读数作为背景。
3. 向样品室中小杯内的空白 Hoechst 33258 分析溶液中加 2μl DNA 标准品，用特氟纶搅拌棒或盖上并颠倒小杯混匀。以相对荧光单位读出发射光值，或者设置浓度的读出值等于最终 DNA 浓度。剩余的 DNA 标准品用新鲜的分析溶液重复测量（如果需要，进行背景零值读数以及仪器调零）。

   样品读数两三次，每次都进行空白读数。不正常或不稳定的空白读数分别表示小杯不干净或溶液中有颗粒物质。
4. 未知样品重复步骤 3。

   浓度为 0.1μg/ml 的染料对于终浓度高达约 500ng/ml 的 DNA 都是足够的。将工作染料浓度提高到 1μg/ml Hoechst 33258 可以将分析的范围扩大到 15μg/ml DNA，但是这样会限制低浓度（5～10ng/ml）的灵敏性。体积≤10μl 的样品可以加入 2.0ml Hoechst 33258 分析溶液。

备择方案 2　用溴化乙锭荧光检测 DNA 和 RNA

相对而言，溴化乙锭几乎不受 DNA 中不同碱基组成的影响，它虽然没有 Hoechst 33258 敏感，但是可以检测纳克级的 DNA，另外也能结合 RNA。

补充材料（同见基本方案；带√项见附录 1）

√ 溴化乙锭分析溶液

1. 将 2.0ml 溴化乙锭分析溶液吸入小杯，放入样品室。设置激发波长为 302nm 或

546nm，发射波长为 590nm。不含 DNA 时读发射值作为背景。

2. 如备择方案 1 步骤 3 读取并校准标准样品。
3. 如备择方案 1 步骤 4 读出未知样品的发射值。

浓度为 5μg/ml 的溴化乙锭分析溶液对于终浓度高达 1000ng/ml 的 DNA 都是足够的，10μg/ml 染料浓度可以将分析的范围扩大到 10μg/ml DNA，但是它仅用于 >1μg/ml的 DNA。体积≤10μl 的样品可以加入 2.0ml 溴化乙锭分析溶液。

参考文献：Labaica and Palgen，1980

撰稿人：Sean R. Gallagher

3E DNA 的 PCR 酶促扩增：标准程序和优化

基本方案 DNA 的 PCR 酶促扩增：标准程序和优化

许多重要的变量都可以影响 PCR 产量。认真滴定 $MgCl_2$ 的浓度至为关键。添加可以提高聚合酶稳定性和活力，或提高杂交严谨性的添加物，以及减少非特异性引物模板相互作用（特别是临界第一个循环之前的）的策略，通常都可以提高扩增效率。

注意： 不要使用 DEPC 处理水、试剂或玻璃器皿。

注意： 试剂应该在无菌的一次性器具（直接从它的包装中取出）内配制，或者用 10%漂白粉溶液浸泡的玻璃器皿，先后用自来水、蒸馏水充分淋洗，如果条件允许，在紫外灯下照射约 10min。每个试剂的多种不同小体积应该分别保存在螺旋盖管内。于是它便可成为使用者自己的“试剂盒”了。我们推荐使用薄壁 PCR 管。

材料（带√项见附录 1）

无菌水

15mmol/L（L）、30mmol/L（M）和 45mmol/L（H）$MgCl_2$

√ 10×无 $MgCl_2$ 的 PCR 扩增缓冲液

√ 25mmol/L 4dNTP 混合物

50μmol/L 寡核苷酸引物 1：50pmol/μl，溶于无菌水（保存于－20℃）

50μmol/L 寡核苷酸引物 2：50pmol/μl，溶于无菌水（保存于－20℃）

模板 DNA：1μg 哺乳动物基因组 DNA 或 1.0～100.0pg 的质粒 DNA

5U/μl Taq DNA 聚合酶（天然或重组；有许多供应商）

√ 增强试剂（可选）

TaqStart 抗体（Clontech）

矿物油

Ficoll 400（可选）

酒石黄（Tartrazine）染料（可选）

薄壁 PCR 管

自动热循环仪

1. 根据表 A. 3E. 1 给出的配方制备 4 个反应主要混合物。

表 A. 3E. 1　优化反应组分所用主要混合物

组　分	终浓度	每个反应	主要混合物[a]/μl			
			Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ
10×PCR 缓冲液	1×	10μl	40.0	40.0	40.0	40.0
引物 1	0.5μmol/L	1μl	4.0	4.0	4.0	4.0
引物 2	0.5μmol/L	1μl	4.0	4.0	4.0	4.0
模板 DNA	不稀释	1 体积[b]	4 体积[b]	4 体积[b]	4 体积[b]	4 体积[b]
25mmol/L 4dNTP 混合物[c]	0.2μmol/L	0.8μl	3.2	3.2	3.2	3.2
Taq DNA 聚合酶	2.5U	0.5μl	2.0	2.0	2.0	2.0
DMSO[d](20×)	5%	5μl	—	20.0	—	—
甘油[d](10×)	10%	10μl	—	—	40.0	—
PMPE[d](100×)	1%	1μl	—	—	—	4.0
水	—	补到 90μl	补到 360	补到 360	补到 360	补到 360

a. 总体积＝360μl(足够作四个反应)。

b. 模板 DNA 体积，通常为 1～10μl。

c. 如果喜欢使用 2mmol/L 4dNTP 混合物，则每个反应加 10μl，或每个主要混合物加 40μl；相应调节水的体积。

d. 用其他可用的增强试剂(见配方)替代。

2. 每个 0.5ml 薄壁 PCR 管中加 90μl 主要混合物 I，共 3 管，分别标记为 I-L、I-M 和 I-H。同样的，等分混合物 II-IV 到正确标记的管中。在每种主要混合物的一个管中加入 10μl 15 mmol/L $MgCl_2$（标作 L；终浓度为 1.5mmol/L)。同样，等分 10μl 30mmol/L 和 45mmol/L $MgCl_2$到每种主要混合物的不同管中（分别标作 M 和 H；终浓度分别为 3.0mmol/L 和 4.5mmol/L)。
3. 加 50～100μl（2～3 滴）矿物油覆盖反应混合物。

为了在第一步采用热启动，在加入 $MgCl_2$之前先覆盖反应混合物，样品在自动热循环仪或其他加热装置中加热到 95℃，一旦达到高温立即加入 $MgCl_2$。$MgCl_2$一旦加入，进行 PCR 前不能让样品温度降低到最适退火温度以下。

4. 根据生产商的说明书，按下列程序设置自动热循环仪。

30 个循环：	30s	94℃	（变性）
	30s	55℃（GC 含量≤50%）或	
		60℃（GC 含量≥50%）	（复性）
	约 60s/kb		
	产物序列	72℃	（延伸）

循环参数取决于模板 DNA 序列和长度、引物序列和互补百分数，以及所用热循环仪的加热速度。

循环数依赖于反应效率和反应中 DNA 模板量。

5. 每个反应取 10μl 作电泳分析，电泳可以在适合 PCR 产物预期大小的琼脂糖、非变性

聚丙烯酰胺或分子筛琼脂糖凝胶上进行。用溴化乙锭染色。

6. 检查染色的凝胶以确定哪一种条件可以得到最大量的产物。
7. 为了确定主要的产物是正确的，用已知的可以切开 PCR 产物的限制性内切酶消化一小份产物。检查所选限制性内切酶缓冲液是否匹配。如果必要，加入 Na^+ 或在乙醇中沉淀，然后重悬在正确的缓冲液中。在凝胶上电泳鉴定消化产物以确定得到的片断具有预期的大小。

这些优化步骤优化了起始的杂交，可能提高效率和产量。当检测到引物二聚体和其他非特异性产物时，当起始模板量很少时，或当需从复杂混合物中扩增稀有序列时，都可以使用这些步骤。为了优化反应，在起始变性和复性步骤中应该避免多聚化的进行。

8. 准备 4 个反应混合物，使用步骤 6 中确定的最佳 $MgCl_2$ 浓度和所需添加物。根据表 A. 3E. 2 的配方准备混合物。使用以下不同方案加入 Taq DNA 聚合酶。
   a. 在室温下准备反应 A 和 C。
   b. 反应 B 的所有组分在组合前在冰浴中预冷。
   c. 进行反应 D 时，将 1. 0μl TaqStart 抗体与 4. 0μl 稀释缓冲液（与抗体一起提供）混合，加入 1. 0μl Taq DNA 聚合酶（这些组分以 1∶4∶1 混合），混匀，加入反应混合物 D 之前室温孵育 5～10min（甘油和 PMPE 与 TaqStart 抗体相兼容，但是 DMSO 会影响抗体的结合）。
9. 用 50～100μl 矿物油覆盖每个反应混合物。
10. 94℃加热所有反应 5min。
11. 将反应的温度降至步骤 4 得到的合适的退火温度。反应 C 中加入 0. 5μl Taq DNA 聚合酶，确定吸管头部穿过矿物油层进入反应混合物。
12. 立即启动所有 4 个反应的扩增，使用以前相同的循环参数。
13. 在琼脂糖凝胶上分析 PCR 产物，同步骤 5 和 6 估计结果。
14. 准备一批最佳反应混合物，但是不用 Taq DNA 聚合酶。TaqStart 抗体、PMPE 和 4dNTP 混合物——这些成分应该在临用之前新鲜加入。如果需要，加入 Ficoll 400 至终浓度 0. 5%～1%（v/v）以及酒石黄至终浓度 1mmol/L。

    反应中加入 Ficoll 400 和酒石黄染料后可以不需要加入凝胶上样缓冲液，而直接将 PCR 产物用于凝胶或丙烯酰胺凝胶分析。

15. 如果必要，可以使用其他 PCR 优化产品（表 A. 3E. 3），热稳定 DNA 聚合酶（表 A. 3E. 4），和/或热稳定 DNA 聚合酶混合液（表 A. 3E. 5）以进一步优化反应。

    表 A. 3E. 2 到 A. 3E. 5 在 A3～29 到 A3～32 页。

互联网资源

http://www.promega.com/techserve/

http://www.genome.wi.mit.edu/

http://www.alkami.com/primers/idxprmr.htm

参考文献：Saiki et al.，1988

撰稿人：Martha F. Kramer and Donald M. Coen

表 A. 3E. 2　优化第一个循环反应的主要混合物

组　分	终浓度	主要混合物/μl			
		A	B	C	D
10×PCR 缓冲液	1×	10	10	10	10
$MgCl_2$(L、M 或 H)	最佳	10	10	10	10
引物 1	0.5μmol/L	1.0	1.0	1.0	1.0
引物 2	0.5μmol/L	1.0	1.0	1.0	1.0
添加物	最佳	V[a]	V[a]	V[a]	V[a]
模板 DNA	—[b]	V[a]	V[a]	V[a]	V[a]
25mmol/L 4dNTP 混合物[b]	0.2mmol/L	0.8	0.8	0.8	0.8
Taq 聚合酶	2.5U	0.5	0.5	—	—
Taq pol+TaqStart	2.5U	—	—	—	1.0
水	补足 100μl	V[a]	V[a]	V[a]	V[a]
制备温度		室温	冰浴	室温	室温

a. V,变量(总体积为 100μl)。

b. 使用不经稀释和稀释的模板 DNA,基于步骤 6 得到的结果。

表 A. 3E. 3　PCR 优化产品

优化目标	供应商	产　品
优化支持	ABI-Perkin-Elmer	产品目录附录中的技术信息
优化支持	Promega	互联网上的 PCR 故障解决程序:http://www.promega.com/amplification/assistant
优化试剂盒	Boehringer-Mannheim, Invitrogen, Stratagene, Sigma, Epicentre Technologies, Life Technologies	若干缓冲液,Mg^{2+}和增强剂,包括 DMSO、甘油、甲酰胺、$(NH_4)_2SO_4$以及其他非特指的或专利试剂
快速启动	Amersham Pharmacia Biotech	Ready-To-Go beads"用于优化标准 PCR"和 Ready-To-Go RAPD 分析珠子(缓冲液、核苷酸、Taq DNA 聚合酶)
快速启动	Fisher	EasyStart PCR Mix-in-a Tube——管中预包装有石蜡珠子,其中含有缓冲液、Mg^{2+}、核苷酸、Taq DNA 聚合酶
快速启动	Life Technologies	PCR SuperMix_1.1×浓度——预混合物含有缓冲液、Mg^{2+}、核苷酸、Taq DNA 聚合酶
快速启动	Marsh Biomedical	Advanced Biochemicals Red Hot DNA Polymerase——Taq DNA 聚合酶的一个新对手,使用方便
热启动/物理屏障	Fisher, Life Technologies	Molecular Bio-Products Hotstart Storage and Reaction Tubes——用石蜡珠子预黏附在每个管中;要求在高温下手工加入一个组分

续表

优化目标	供应商	产　品
热启动/分开 $MgCl_2$	Invitrogen	HotWax Mg^{2+} beads——石蜡珠子中含有预制的 $MgCl_2$，在第一个升温步骤中释放
热启动/分开 $MgCl_2$	Stratagene	StrataSphere Magnesium Wax Beads——石蜡珠子含有预制的 $MgCl_2$
热启动/分开聚合酶	Promega	TaqBead Hot Start Polymerase——石蜡珠子包裹 Taq DNA 聚合酶，在第一个升温步骤中释放
热启动/通过抗体结合可逆的使聚合酶失活	Clontech	TaqStart Antibody，TthStart Antibody——可逆地失活 Taq 和 Tth DNA 聚合酶，直至第一次 95℃变性
热启动/抗体结合	Life Technologies	PlatinumTaq——含有 PlatinumTaq 抗体
热启动/抗体结合	Sigma	JumpStart Taq——含有 TaqStart 抗体
热启动/可逆化学修饰	ABI-Perkin-Elmer	AmpliTaq Gold——在高温下活化
热启动/可逆化学修饰	Qiagen	HotStart Taq DNA polymerase——在高温下活化
增强剂	Boehringer-Mannheim，New England Biolabs	Tth 焦磷酸酶，热稳定
增强剂	Clontech	GC-Melt(在 Advantage-GC 试剂盒中)——专利
增强剂	CPG	Taq-FORCE Amplification System and MIGHTY Buffer——专利
增强剂	Fisher	Eppendorf MasterTaq Kit with TaqMaster Enhancer——专利
增强剂	Life Technologies	PCRx Enhancer System——专利
增强剂	Promega	E. coli Single Stranded Binding Protein(SSB)
增强剂	Qiagen	Q-Solution——专利
增强剂	Stratagene	Perfect Match Polymerase Enhancer——专利
增强剂	Stratagene	TaqExtender PCR Additive——专利

表 A. 3E. 4　热稳定性 DNA 聚合酶

DNA 聚合酶		生物来源	供应商	产物末端	外切核酸酶活性
一般名称	商业名称				
Pfu	—	Pyrococcus furiosus	Stratagene，Promega	平端	3′～5′(校正)
Pfu(exo-)	—	Pyrococcus furiosus	Stratagene	平端	无
Psp	Deep Vent	Pyrococcus sp. GB-D	New England Biolabs	平端	3′～5′(校正)
Psp(exo-)	Deep Vent (exo-)	Pyrococcus sp. GB-D	New England Biolabs	平端	无
Pwo		Pyrococcus woesei	Boehringer-Mannheim	平端	3′～5′(校正)

DNA 聚合酶		生物来源	供应商	产物末端	外切核酸酶活性
一般名称	商业名称				
Taq[天然和(或)重组]	—	Thermus aquaticus	Ambion, Amersham Pharmacia Biotech, Boehringer-Mannheim, Clontech, Fisher, Life Technologies, Marsh Biomedical, ABI-Perkin-Elmer, Promega, Qiagen, Sigma, Stratagene	3′A	5′～3′
Taq,N 端缺失	Stoffel 片段 Klen-Taq	Thermus aquaticus	ABI-Perkin-Elmer,Sigma	3′A	无
Tbr	DyNAzyme	Thermus brocianus	MJ research	—[a]	5′～3′
Tfl		Thermus flavus	Promega, Epicentre Technologies	平末端	—[a]
Tli	Vent	Thermococcus litoralis	New England Biolabs (Vent), Promega	平末端	3′～5′(校正)
Tli(exo-)	Vent(exo-)	Thermococcus litoralis	New England Biolabs	平末端	无
Tma	UITma	Thermotoga maritima	ABI-Perkin-Elmer	平末端	3′～5′(校正)
Tth	—	Thermus thermophilus	Amersham Pharmacia Biotech, Boehringer-Mannheim, Clontech, Epicentre Technologies, ABI-Perkin-Elmer, Promega	3′A	5′～3′

a. 当时还没有信息。

表 A.3E.5 热稳定性 DNA 聚合酶混合物

产品(商品名)	供应商	热稳定性 DNA 聚合酶和其他成分
Expand High Fidelity, Expand Long Template, and Expand 20kb PCR Systems	Boehringer-Mannheim	Taq+Pwo
KlenTaq LA Polymerase Mix	Clontech, Sigma	KlenTaq-1(5′外切核酸酶缺失 Taq)+非特指保真聚合酶

续表

产品(商品名)	供应商	热稳定性 DNA 聚合酶和其他成分
Advantage-HF PCR Kit	Clontech	KlenTaq-1＋非特指保真聚合酶＋TaqStart 抗体
Advantage-cDNA and Advantage-GC cDNA Polymerase Mixes and Kits	Clontech	KlenTaq-1＋非特指保真聚合酶＋TaqStart 抗体；GC 试剂盒含有 GC Melt
Advantage Genomic and Advantage-GC Genomic Polymerase Mixes and Kits	Clontech	Tth＋非特指保真聚合酶＋TthStart 抗体；GC 试剂盒含有 GC Melt
eLONGase Enzyme Mix	Life Technologies	Taq＋Psp＋非特指保真聚合酶＋ eLONGase 缓冲液
Platinum Taq DNA Polymerase	Life Technologies	Taq＋Psp＋Platinum Taq 抗体
Platinum High Fidelity DNA Polymerase	Life Technologies	Taq＋Psp＋Taq 抗体
DyNAzyme EXT Polymerase	MJ research	Tbr＋非特指增强剂
GeneAmp XL PCR and XL RNA PCR Kits	ABI-Perkin-Elmer	Tth＋Tli
OmniBase Sequencing Enzyme Mix	Promega	非特指保真聚合酶＋热稳定焦磷酸酶
AccuTaq LA DNA Polymerase Mix	Sigma	Taq＋非特指保真聚合酶
TaqPlus Long and TaqPlus Precision PCR Systems	Stratagene	Pfu＋Taq；TaqPlus Precision Reaction Buffer(专利)
Accurase Fidelity PCR Enzyme Mix; Calypso High Fidelity Single Tube RT-PCR System	Tetralink	Thermus sp. ＋ Thermococcus sp. ：Calypso 也含有 AMV-RT

3F　微量 RT-PCR

基本方案　微量 RT-PCR

警告：当进行放射性操作时，采取正确的防护措施以避免污染实验者和周围环境。在正确指定的区域内进行实验以及处理废物，按照当地放射性安全官员提供的指导进行。

注意：DEPC 被怀疑具有致癌性，操作务须谨慎。

材料（带√项见附录 1）

√ DEPC 处理的水

20U/μl RNase 抑制剂（ABI-Perkin Elmer）

RNA 沉淀，干燥（支持方案）

5×RT 缓冲液（GenHunter）

250μmol/L dNTP（GenHunter）

10μmol/L 随机六聚物或 oligo（dT）引物（ABI-Perkin Elmer）

100U/μl MMLV 反转录酶（Stratagene）

10×PCR 缓冲液（Perkin Elmer）：500mmol/L KCl/15mmol/L $MgCl_2$/1mg/ml 明胶（溶于 100mmol/L Tris·Cl，pH8.4，见配方）

10μmol/L 上游引物

10μmol/L 下游引物

5 U/μl Taq DNA 聚合酶（ABI-Perkin Elmer）

10m Ci/ml ^{32}P-dCTP 或^{33}P-dCTP（约 300 Ci/mmol）

12μl PCR 管，无 RNase

热循环仪

1. 将 24μl DEPC 处理的水和 1μl RNase 抑制剂加到干燥的 RNA 沉淀上。将重溶的 RNA 等分成 12μl 液滴放入无 RNase 的 PCR 管中，分别标上 RT(+)和 RT(−)。

对于随机六聚物

2a. 每管中加入 4μl 5×RT 缓冲液，2μl 250μmol/L dNTPs 和 1μl 10μmol/L 随机六聚物。65℃孵育 5min，25℃孵育 10min。

3a. RT(+）管中加入 1μl 100U/μl MMLV 反转录酶。RT(−）管中加 1μl DEPC 处理的水以维持相同的体积。25℃孵育 10min，37℃孵育 40min，95℃孵育 5min。

对于 oligo(dT)

2b. 每管中加入 4μl 5×RT 缓冲液，2μl 250μmol/L dNTPs 和 2μl 10μmol/L oligo (dT)。65℃孵育 5min，37℃孵育 10min。

3b. RT(+）管中加入 1μl 100U/μl MMLV 反转录酶。RT(−）管中加 1μl DEPC 处理的水以维持相同的体积。37℃孵育 50min，95℃孵育 5min。

4. 取 1.5μl RT(+）和 RT(−）cDNA 混合物，加到正确标记的无 RNase 的微型离心管中，每个加入下列物质：

 1.0μl 10×PCR 缓冲液

 0.8μl 250μmol/L dNTPs

 0.2μl 10μmol/L 上游引物

 0.2μl 10μmol/L 下游引物

 0.2μl 5 U/μl Taq DNA 聚合酶

 0.2μl ^{32}P-dCTP 或^{33}P-dCTP

 5.9μl DEPC 处理的水

 反应混合物在热循环仪上 94℃加热 2min。

5. 如下在热循环仪上运行 35 个循环以扩增 cDNA：

 45s 94℃（变性）

 45s 50℃（复性）

 2min 72℃（延伸）

 2min 94℃（变性）

保持 4℃直至使用。

6. 在 2%琼脂糖凝胶（如 NaSieve 预制凝胶）上分离 10μl RT（+）和 RT（-），用溴化乙锭染色。

支持方案　微量 RNA 的分离

注意：因为在微量分装材料中的起始材料仅在 10～100ng 之间，所以绝对有必要仅使用 DEPC 处理的水使核糖核酸酶失活，仅使用认证为"无 RNase"的实验室器具，并且总是要戴手套。

材料（同见基本方案；带√项见附录 1）

组织
微量 RNA 分离试剂盒（Stratagene）含有：
变性溶液
2-巯基乙醇
水饱和酚
2mol/L 乙酸钠，pH4.0
1μg/μl 糖原
异丙醇，冷
49∶1（v/v）氯仿/异戊醇
60%乙醇/40%DEPC 处理的水（见配方）
√ DEPC 处理的水
信使纯化试剂盒（GenHunter）含有：
RNase 抑制剂
10×反应缓冲液
10U/μl mg/ml DNase
RNase Away（Molecular Bio-Products）
无 RNase 的小管（Eppendorf）

1. 从组织上显微切割至少 1000 个细胞（单元 2.5），放置于无 RNase 的小管中。也可以选择使用小量的组织样品。
2. 用 200μl 变性缓冲液和 1.6μl 2-巯基乙醇裂解细胞。将裂解液转移到无 RNase 的小管中，剧烈涡旋。
3. 向裂解液中加入 220μl 水饱和酚、60μl 49∶1 氯仿/异戊醇和 20μl 2mol/L 醋酸钠，pH4.0。剧烈蜗旋 1min。小管在湿冰浴中孵育 15min。4℃，12 000r/min 离心 30min。
4. 将水相（上层）转移到新的无 RNase 小管中，特别注意不要转移任何有机层（底部）。向新管中加入 2μl 1μg/μl 糖原（或 1μg/μl tRNA）作为载体。加入 200μl 冷的异丙醇，干燥的冰上放置 30min。

5. 4℃，12 000r/min 离心 30min。用灯芯小心吸除上清液。
6. 加入 400μl 60%乙醇/40%DEPC 处理的水。4℃，12 000r/min 离心 5min。去除上清液。重复一次。
7. 用 SpeedVac 蒸发器干燥 RNA。如果必要，保存在－80℃直至进一步使用。

   RT-PCR 似乎也可以扩增污染的 DNA。为了保证 RNA 产物的纯度，非常推荐分离 RNA 时进行 DNase 处理。
8. 加入 15μl DEPC 处理的水、1μl RNase 抑制剂和 2μl 10×反应缓冲液。50℃孵育 3min。
9. 加入 2μl 10U/μl DNase，37℃孵育 2h。
10. 加入 22μl 水饱和酚、6μl 49∶1 氯仿/异戊醇和 2μl 2mol/L 醋酸钠，pH4.0。置于湿冰浴 15min。4℃，12 000r/min 离心 10min。将上层转移到新的无 RNase 小管中。
11. 向管中加入 2μl 1μg/μl 糖原。加入 200μl 冷的异丙醇，干燥的冰上放置 30min。4℃，14 000r/min 离心 30min。用灯芯小心吸除上清液。
12. 加入 400μl 60%乙醇/40%DEPC 处理的水。4℃，14 000r/min 离心 5min。用灯芯吸除上清液。用 SpeedVac 蒸发器除去任何残留的液体。如果必要，－80℃保存过夜。

互联网资源

http://cgap-mf.nih.gov/protocols

参考文献：Chirgwin et al，1979；Krizman et al.，1998

撰稿人：Cloud P. Paweletz，Lu Charboneau and Lance A. Liotta

（赵永娟 译）

附录 4　试剂和仪器设备供应商选录

下列为供应商家的地址和电话号码，它们的某些特殊产品在我们的指南中被推荐应用，其理由是：①特定的品牌确实是高质量的；②其产品在市场上不易购置到。因此，本汇编可能没有包括某些生物可供应的重要商家。更全面的供应商名录请参见 Linsocott 免疫学和生物学试剂辞典（Santa Rosa CA），生物技术学辞典（Stockton 出版社，纽约），生物/技术学杂志附录中的购货指南，以及互联网上的各个销售点。

附录4 试剂和仪器设备供应商选录

Listed below are addresses and phone numbers of commercial suppliers who have been recommended for particular items used in our manuals because: (1) the particular brand has actually been found to be of superior quality, or (2) the item is difficult to find in the marketplace. Consequently, this compilation may not include some important vendors of biological supplies. For comprehensive listings, see *Linscott's Directory of Immunological and Biological Reagents* (Santa Rosa, CA), *The Biotechnology Directory* (Stockton Press, New York), the annual Buyers' Guide supplement to the journal *Bio/Technology*, as well as various sites on the Internet.

A.C. Daniels
72-80 Akeman Street
Tring, Hertfordshire, HP23 6AJ, UK
(44) 1442 826881
FAX: (44) 1442 826880

A.D. Instruments
5111 Nations Crossing Road #8
Suite 2
Charlotte, NC 28217
(704) 522-8415 FAX: (704) 527-5005
http://www.us.endress.com

A.J. Buck
11407 Cronhill Drive
Owings Mill, MD 21117
(800) 638-8673 FAX: (410) 581-1809
(410) 581-1800
http://www.ajbuck.com

A.M. Systems
131 Business Park Loop
P.O. Box 850
Carlsborg, WA 98324
(800) 426-1306 FAX: (360) 683-3525
(360) 683-8300
http://www.a-msystems.com

Aaron Medical Industries
7100 30th Avenue North
St. Petersburg, FL 33710
(727) 384-2323 FAX: (727) 347-9144
http://www.aaronmed.com

Abbott Laboratories
100 Abbott Park Road
Abbott Park, IL 60064
(800) 323-9100 FAX: (847) 938-7424
http://www.abbott.com

ABCO Dealers
55 Church Street Central Plaza
Lowell, MA 01852
(800) 462-3326 (978) 459-6101
http://www.lomedco.com/abco.htm

Aber Instruments
5 Science Park
Aberystwyth, Wales SY23 3AH, UK
(44) 1970 636300
FAX: (44) 1970 615455
http://www.aber-instruments.co.uk

ABI Biotechnologies
See Perkin-Elmer

ABI Biotechnology
See Apotex

Access Technologies
Subsidiary of Norfolk Medical
7350 N. Ridgeway
Skokie, IL 60076
(877) 674-7131 FAX: (847) 674-7066
(847) 674-7131
http://www.norfolkaccess.com

Accurate Chemical and Scientific
300 Shames Drive
Westbury, NY 11590
(800) 645-6264 FAX: (516) 997-4948
(516) 333-2221
http://www.accuratechemical.com

AccuScan Instruments
5090 Trabue Road
Columbus, OH 43228
(800) 822-1344 FAX: (614) 878-3560
(614) 878-6644
http://www.accuscan-usa.com

AccuStandard
125 Market Street
New Haven, CT 06513
(800) 442-5290 FAX: (877) 786-5287
http://www.accustandard.com

Ace Glass
1430 NW Boulevard
Vineland, NJ 08360
(800) 223-4524 FAX: (800) 543-6752
(609) 692-3333

ACO Pacific
2604 Read Avenue
Belmont, CA 94002
(650) 595-8588 FAX: (650) 591-2891
http://www.acopacific.com

Acros Organic
See Fisher Scientific

Action Scientific
P.O. Box 1369
Carolina Beach, NC 28428
(910) 458-0401 FAX: (910) 458-0407

AD Instruments
1949 Landings Drive
Mountain View, CA 94043
(888) 965-6040 FAX: (650) 965-9293
(650) 965-9292
http://www.adinstruments.com

Adaptive Biosystems
15 Ribocon Way
Progress Park
Luton, Bedsfordshire LU4 9UR, UK
(44)1 582-597676
FAX: (44)1 582-581495
http://www.adaptive.co.uk

Adobe Systems
1585 Charleston Road
P.O. Box 7900
Mountain View, CA 94039
(800) 833-6687 FAX: (415) 961-3769
(415) 961-4400
http://www.adobe.com

Advanced Bioscience Resources
1516 Oak Street, Suite 303
Alameda, CA 94501
(510) 865-5872 FAX: (510) 865-4090

Advanced Biotechnologies
9108 Guilford Road
Columbia, MD 21046
(800) 426-0764 FAX: (301) 497-9773
(301) 470-3220
http://www.abionline.com

Advanced ChemTech
5609 Fern Valley Road
Louisville, KY 40228
(502) 969-0000
http://www.peptide.com

Advanced Machining and Tooling
9850 Businesspark Avenue
San Diego, CA 92131
(858) 530-0751 FAX: (858) 530-0611
http://www.amtmfg.com

Advanced Magnetics
See PerSeptive Biosystems

Advanced Process Supply
See Naz-Dar-KC Chicago

Advanced Separation Technologies
37 Leslie Court
P.O. Box 297
Whippany, NJ 07981
(973) 428-9080 FAX: (973) 428-0152
http://www.astecusa.com

Advanced Targeting Systems
11175-A Flintkote Avenue
San Diego, CA 92121
(877) 889-2288 FAX: (858) 642-1989
(858) 642-1988
http://www.ATSbio.com

Advent Research Materials
Eynsham, Oxford OX29 4JA, UK
(44) 1865-884440
FAX: (44) 1865-84460
http://www.advent-rm.com

Advet
Industrivagen 24
S-972 54 Lulea, Sweden
(46) 0920-211887
FAX: (46) 0920-13773

Aesculap
1000 Gateway Boulevard
South San Francisco, CA 94080
(800) 282-9000
http://www.aesculap.com

Affinity Chromatography
307 Huntingdon Road
Girton, Cambridge CB3 OJX, UK
(44) 1223 277192
FAX: (44) 1223 277502
http://www.affinity-chrom.com

Affinity Sensors
See Labsystems Affinity Sensors

Affymetrix
3380 Central Expressway
Santa Clara, CA 95051
(408) 731-5000 FAX: (408) 481-0422
(800) 362-2447
http://www.affymetrix.com

Agar Scientific
66a Cambridge Road
Stansted CM24 8DA, UK
(44) 1279-813-519
FAX: (44) 1279-815-106
http://www.agarscientific.com

A/G Technology
101 Hampton Avenue
Needham, MA 02494
(800) AGT-2535 FAX: (781) 449-5786
(781) 449-5774
http://www.agtech.com

Agen Biomedical Limited
11 Durbell Street
P.O. Box 391
Acacia Ridge 4110
Brisbane, Australia
61-7-3370-6300 FAX: 61-7-3370-6370
http://www.agen.com

Agilent Technologies
395 Page Mill Road
P.O. Box 10395
Palo Alto, CA 94306
(650) 752-5000
http://www.agilent.com/chem

Agouron Pharmaceuticals
10350 N. Torrey Pines Road
La Jolla, CA 92037
(858) 622-3000 FAX: (858) 622-3298
http://www.agouron.com

Agracetus
8520 University Green
Middleton, WI 53562
(608) 836-7300 FAX: (608) 836-9710
http://www.monsanto.com

AIDS Research and Reference
Reagent Program
U.S. Department of Health and
Human Services
625 Lofstrand Lane
Rockville, MD 20850
(301) 340-0245 FAX: (301) 340-9245
http://www.aidsreagent.org

AIN Plastics
249 East Sanford Boulevard
P.O. Box 151
Mt. Vernon, NY 10550
(914) 668-6800 FAX: (914) 668-8820
http://www.tincna.com

Air Products and Chemicals
7201 Hamilton Boulevard
Allentown, PA 18195
(800) 345-3148 FAX: (610) 481-4381
(610) 481-6799
http://www.airproducts.com

ALA Scientific Instruments
1100 Shames Drive
Westbury, NY 11590
(516) 997-5780 FAX: (516) 997-0528
http://www.alascience.com

Aladin Enterprises
1255 23rd Avenue
San Francisco, CA 94122
(415) 468-0433 FAX: (415) 468-5607

Aladdin Systems
165 Westridge Drive
Watsonville, CA 95076
(831) 761-6200 FAX: (831) 761-6206
http://www.aladdinsys.com

Alcide
8561 154th Avenue NE
Redmond, WA 98052
(800) 543-2133 FAX: (425) 861-0173
(425) 882-2555
http://www.alcide.com

Aldevron
3233 15th Street, South
Fargo, ND 58104
(877) Pure-DNA FAX: (701) 280-1642
(701) 297-9256
http://www.aldevron.com

Aldrich Chemical
P.O. Box 2060
Milwaukee, WI 53201
(800) 558-9160 FAX: (800) 962-9591
(414) 273-3850 FAX: (414) 273-4979
http://www.aldrich.sial.com

Alexis Biochemicals
6181 Cornerstone Court East, Suite 103
San Diego, CA 92121
(800) 900-0065 FAX: (858) 658-9224
(858) 658-0065
http://www.alexis-corp.com

Alfa Aesar
30 Bond Street
Ward Hill, MA 10835
(800) 343-0660 FAX: (800) 322-4757
(978) 521-6300 FAX: (978) 521-6350
http://www.alfa.com

Alfa Laval
Avenue de Ble 5 - Bazellaan 5
BE-1140 Brussels, Belgium
32(2) 728 3811
FAX: 32(2) 728 3917 or 32(2) 728 3985
http://www.alfalaval.com

Alice King Chatham Medical Arts
11915-17 Inglewood Avenue
Hawthorne, CA 90250
(310) 970-1834 FAX: (310) 970-0121
(310) 970-1063

Allegiance Healthcare
800-964-5227
http://www.allegiance.net

Allelix Biopharmaceuticals
6850 Gorway Drive
Mississauga, Ontario
L4V 1V7 Canada
(905) 677-0831 FAX: (905) 677-9595
http://www.allelix.com

Allentown Caging Equipment
Route 526, P.O. Box 698
Allentown, NJ 08501
(800) 762-CAGE FAX: (609) 259-0449
(609) 259-7951
http://www.acecaging.com

Alltech Associates
Applied Science Labs
2051 Waukegan Road
P.O. Box 23
Deerfield, IL 60015
(800) 255-8324 FAX: (847) 948-1078
(847) 948-8600
http://www.alltechweb.com

Alomone Labs
HaMarpeh 5
P.O. Box 4287
Jerusalem 91042, Israel
972-2-587-2202 FAX: 972-2-587-1101
US: (800) 791-3904
FAX: (800) 791-3912
http://www.alomone.com

Alpha Innotech
14743 Catalina Street
San Leandro, CA 94577
(800) 795-5556 FAX: (510) 483-3227
(510) 483-9620
http://www.alphainnotech.com

Altec Plastics
116 B Street
Boston, MA 02127
(800) 477-8196 FAX: (617) 269-8484
(617) 269-1400

Alza
1900 Charleston Road
P.O. Box 7210
Mountain View, CA 94043
(800) 692-2990 FAX: (650) 564-7070
(650) 564-5000
http://www.alza.com

Alzet
c/o Durect Corporation
P.O. Box 530
10240 Bubb Road
Cupertino, CA 95015
(800) 692-2990 (408) 367-4036
FAX: (408) 865-1406
http://www.alzet.com

Amac
160B Larrabee Road
Westbrook, ME 04092
(800) 458-5060 FAX: (207) 854-0116
(207) 854-0426

Amaresco
30175 Solon Industrial Parkway
Solon, Ohio 44139
(800) 366-1313 FAX: (440) 349-1182
(440) 349-1313

Ambion
2130 Woodward Street, Suite 200
Austin, TX 78744
(800) 888-8804 FAX: (512) 651-0190
(512) 651-0200
http://www.ambion.com

American Association of
Blood Banks
College of American Pathologists
325 Waukegan Road
Northfield, IL 60093
(800) 323-4040 FAX: (847) 8166
(847) 832-7000
http://www.cap.org

American Bio-Technologies
See Intracel Corporation

American Bioanalytical
15 Erie Drive
Natick, MA 01760
(800) 443-0600 FAX: (508) 655-2754
(508) 655-4336
http://www.americanbio.com

American Cyanamid
P.O. Box 400
Princeton, NJ 08543
(609) 799-0400 FAX: (609) 275-3502
http://www.cyanamid.com

American HistoLabs
7605-F Airpark Road
Gaithersburg, MD 20879
(301) 330-1200 FAX: (301) 330-6059

American International Chemical
17 Strathmore Road
Natick, MA 01760
(800) 238-0001 (508) 655-5805
http://www.aicma.com

American Laboratory Supply
See American Bioanalytical

American Medical Systems
10700 Bren Road West
Minnetonka, MN 55343
(800) 328-3881 FAX: (612) 930-6654
(612) 933-4666
http://www.visitams.com

American Qualex
920-A Calle Negocio
San Clemente, CA 92673
(949) 492-8298 FAX: (949) 492-6790
http://www.americanqualex.com

American Radiolabeled Chemicals
11624 Bowling Green
St. Louis, MO 63146
(800) 331-6661 FAX: (800) 999-9925
(314) 991-4545 FAX: (314) 991-4692
http://www.arc-inc.com

American Scientific Products
See VWR Scientific Products

American Society for
Histocompatibility and
Immunogenetics
P.O. Box 15804
Lenexa, KS 66285
(913) 541-0009 FAX: (913) 541-0156
http://www.swmed.edu/home_pages/ASHI
/ashi.htm

American Type Culture Collection (ATCC)
10801 University Boulevard
Manassas, VA 20110
(800) 638-6597 FAX: (703) 365-2750
(703) 365-2700
http://www.atcc.org

Amersham
See Amersham Pharmacia Biotech

Amersham International
Amersham Place
Little Chalfont, Buckinghamshire
HP7 9NA, UK
(44) 1494-544100
FAX: (44) 1494-544350
http://www.apbiotech.com

Amersham Medi-Physics
Also see Nycomed Amersham
3350 North Ridge Avenue
Arlington Heights, IL 60004
(800) 292-8514 FAX: (800) 807-2382
http://www.nycomed-amersham.com

Amersham Pharmacia Biotech
800 Centennial Avenue
P.O. Box 1327
Piscataway, NJ 08855
(800) 526-3593 FAX: (877) 295-8102
(732) 457-8000
http://www.apbiotech.com

Amgen
1 Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320
(800) 926-4369 FAX: (805) 498-9377
(805) 447-5725
http://www.amgen.com

Amicon
Scientific Systems Division
72 Cherry Hill Drive
Beverly, MA 01915
(800) 426-4266 FAX: (978) 777-6204
(978) 777-3622
http://www.amicon.com

Amika
8980F Route 108
Oakland Center
Columbia, MD 21045
(800) 547-6766 FAX: (410) 997-7104
(410) 997-0100
http://www.amika.com

Amoco Performance Products
See BPAmoco

AMPI
See Pacer Scientific

Amrad
576 Swan Street
Richmond, Victoria 3121, Australia
613-9208-4000
FAX: 613-9208-4350
http://www.amrad.com.au

Amresco
30175 Solon Industrial Parkway
Solon, OH 44139
(800) 829-2805 FAX: (440) 349-1182
(440) 349-1199

Anachemia Chemicals
3 Lincoln Boulevard
Rouses Point, NY 12979
(800) 323-1414 FAX: (518) 462-1952
(518) 462-1066
http://www.anachemia.com

Ana-Gen Technologies
4015 Fabian Way
Palo Alto, CA 94303
(800) 654-4671 FAX: (650) 494-3893
(650) 494-3894
http://www.ana-gen.com

Analox Instruments USA
P.O. Box 208
Lunenburg, MA 01462
(978) 582-9368 FAX: (978) 582-9588
http://www.analox.com

Analytical Biological Services
Cornell Business Park 701-4
Wilmington, DE 19801
(800) 391-2391 FAX: (302) 654-8046
(302) 654-4492
http://www.ABSbioreagents.com

Analytical Genetics Testing Center
7808 Cherry Creek S. Drive, Suite 201
Denver, CO 80231
(800) 204-4721 FAX: (303) 750-2171
(303) 750-2023
http://www.geneticid.com

AnaSpec
2149 O'Toole Avenue, Suite F
San Jose, CA 95131
(800) 452-5530 FAX: (408) 452-5059
(408) 452-5055
http://www.anaspec.com

Ancare
2647 Grand Avenue
P.O. Box 814
Bellmore, NY 11710
(800) 645-6379 FAX: (516) 781-4937
(516) 781-0755
http://www.ancare.com

Ancell
243 Third Street North
P.O. Box 87
Bayport, MN 55033
(800) 374-9523 FAX: (651) 439-1940
(651) 439-0835
http://www.ancell.com

Anderson Instruments
500 Technology Court
Smyrna, GA 30082
(800) 241-6898 FAX: (770) 319-5306
(770) 319-9999
http://www.graseby.com

Andreas Hettich
Gartenstrasse 100
Postfach 260
D-78732 Tuttlingen, Germany
(49) 7461 705 0
FAX: (49) 7461 705-122
http://www.hettich-centrifugen.de

Anesthetic Vaporizer Services
10185 Main Street
Clarence, NY 14031
(719) 759-8490
http://www.avapor.com

Animal Identification and
Marking Systems (AIMS)
13 Winchester Avenue
Budd Lake, NJ 07828
(908) 684-9105 FAX: (908) 684-9106
http://www.animalid.com

Annovis
34 Mount Pleasant Drive
Aston, PA 19014
(800) EASY-DNA FAX: (610) 361-8255
(610) 361-9224
http://www.annovis.com

Apotex
150 Signet Drive
Weston, Ontario
M9L 1T9 Canada
(416) 749-9300 FAX: (416) 749-2646
http://www.apotex.com

Apple Scientific
11711 Chillicothe Road, Unit 2
P.O. Box 778
Chesterland, OH 44026
(440) 729-3056 FAX: (440) 729-0928
http://www.applesci.com

Applied Biosystems
See PE Biosystems

Applied Imaging
2380 Walsh Avenue, Bldg. B
Santa Clara, CA 95051
(800) 634-3622 FAX: (408) 562-0264
(408) 562-0250
http://www.aicorp.com

Applied Photophysics
203-205 Kingston Road
Leatherhead, Surrey, KT22 7PB
UK
(44) 1372-386537

Applied Precision
1040 12th Avenue Northwest
Issaquah, Washington 98027
(425) 557-1000
FAX: (425) 557-1055
http://www.api.com/index.html

Appligene Oncor
Parc d'Innovation
Rue Geiler de Kaysersberg, BP 72
67402 Illkirch Cedex, France
(33) 88 67 22 67
FAX: (33) 88 67 19 45
http://www.oncor.com/prod-app.htm

Applikon
1165 Chess Drive, Suite G
Foster City, CA 94404
(650) 578-1396 FAX: (650) 578-8836
http://www.applikon.com

Appropriate Technical Resources
9157 Whiskey Bottom Road
Laurel, MD 20723
(800) 827-5931 FAX: (410) 792-2837
http://www.atrbiotech.com

APV Gaulin
100 S. CP Avenue
Lake Mills, WI 53551
(888) 278-4321 FAX: (888) 278-5329
http://www.apv.com

Aqualon
See Hercules Aqualon

Aquarium Systems
8141 Tyler Boulevard
Mentor, OH 44060
(800) 822-1100 FAX: (440) 255-8994
(440) 255-1997
http://www.aquariumsystems.com

Aquebogue Machine and Repair Shop
Box 2055
Main Road
Aquebogue, NY 11931
(631) 722-3635 FAX: (631) 722-3106

Archer Daniels Midland
4666 Faries Parkway
Decatur, IL 62525
(217) 424-5200
http://www.admworld.com

Archimica Florida
P.O. Box 1466
Gainesville, FL 32602
(800) 331-6313 FAX: (352) 371-6246
(352) 376-8246
http://www.archimica.com

Arcor Electronics
1845 Oak Street #15
Northfield, IL 60093
(847) 501-4848

Arcturus Engineering
400 Logue Avenue
Mountain View, CA 94043
(888) 446 7911 FAX: (650) 962 3039
(650) 962 3020
http://www.arctur.com

Ardais Corporation
One Ledgemont Center
128 Spring Street
Lexington, MA 02421
(781) 274-6420 (781) 274-6421
http://www.ardais.com

Argonaut Technologies
887 Industrial Road, Suite G
San Carlos, CA 94070
(650) 998-1350 FAX: (650) 598-1359
http://www.argotech.com

Ariad Pharmaceuticals
26 Landsdowne Street
Cambridge, MA 02139
(617) 494-0400 FAX: (617) 494-8144
http://www.ariad.com

Armour Pharmaceuticals
See Rhone-Poulenc Rorer

Aronex Pharmaceuticals
8707 Technology Forest Place
The Woodlands, TX 77381
(281) 367-1666 FAX: (281) 367-1676
http://www.aronex.com

Artisan Industries
73 Pond Street
Waltham, MA 02254
(617) 893-6800
http://www.artisanind.com

ASI Instruments
12900 Ten Mile Road
Warren, MI 48089
(800) 531-1105 FAX: (810) 756-9737
(810) 756-1222
http://www.asi-instruments.com

Aspen Research Laboratories
1700 Buerkle Road
White Bear Lake, MN 55140
(651) 264-6000 FAX: (651) 264-6270
http://www.aspenresearch.com

Associates of Cape Cod
704 Main Street
Falmouth, MA 02540
(800) LAL-TEST FAX: (508) 540-8680
(508) 540-3444
http://www.acciusa.com

Astra Pharmaceuticals
See AstraZeneca

AstraZeneca
1800 Concord Pike
Wilmington, DE 19850
(302) 886-3000 FAX: (302) 886-2972
http://www.astrazeneca.com

AT Biochem
30 Spring Mill Drive
Malvern, PA 19355
(610) 889-9300 FAX: (610) 889-9304

ATC Diagnostics
See Vysis

ATCC
See American Type Culture Collection

Athens Research and Technology
P.O. Box 5494
Athens, GA 30604
(706) 546-0207 FAX: (706) 546-7395

Atlanta Biologicals
1425-400 Oakbrook Drive
Norcross, GA 30093
(800) 780-7788 or (770) 446-1404
FAX: (800) 780-7374 or (770) 446-1404
http://www.atlantabio.com

Atomergic Chemical
71 Carolyn Boulevard
Farmingdale, NY 11735
(631) 694-9000 FAX: (631) 694-9177
http://www.atomergic.com

Atomic Energy of Canada
2251 Speakman Drive
Mississauga, Ontario
L5K 1B2 Canada
(905) 823-9040 FAX: (905) 823-1290
http://www.aecl.ca

ATR
P.O. Box 460
Laurel, MD 20725
(800) 827-5931 FAX: (410) 792-2837
(301) 470-2799
http://www.atrbiotech.com

Aurora Biosciences
11010 Torreyana Road
San Diego, CA 92121
(858) 404-6600 FAX: (858) 404-6714
http://www.aurorabio.com

Automatic Switch Company
A Division of Emerson Electric
50 Hanover Road
Florham Park, NJ 07932
(800) 937-2726 FAX: (973) 966-2628
(973) 966-2000
http://www.asco.com

Avanti Polar Lipids
700 Industrial Park Drive
Alabaster, AL 35007
(800) 227-0651 FAX: (800) 229-1004
(205) 663-2494 FAX: (205) 663-0756
http://www.avantilipids.com

Aventis
BP 67917
67917 Strasbourg Cedex 9, France
33 (0) 388 99 11 00
FAX: 33 (0) 388 99 11 01
http://www.aventis.com

Aventis Pasteur
1 Discovery Drive
Swiftwater, PA 18370
(800) 822-2463 FAX: (570) 839-0955
(570) 839-7187
http://www.aventispasteur.com/usa

Avery Dennison
150 North Orange Grove Boulevard
Pasadena, CA 91103
(800) 462-8379 FAX: (626) 792-7312
(626) 304-2000
http://www.averydennison.com

Avestin
2450 Don Reid Drive
Ottawa, Ontario
K1H 1E1 Canada
(888) AVESTIN FAX: (613) 736-8086
(613) 736-0019
http://www.avestin.com

AVIV Instruments
750 Vassar Avenue
Lakewood, NJ 08701
(732) 367-1663 FAX: (732) 370-0032
http://www.avivinst.com

Axon Instruments
1101 Chess Drive
Foster City, CA 94404
(650) 571-9400 FAX: (650) 571-9500
http://www.axon.com

Azon
720 Azon Road
Johnson City, NY 13790
(800) 847-9374 FAX: (800) 635-6042
(607) 797-2368
http://www.azon.com

BAbCO
1223 South 47th Street
Richmond, CA 94804
(800) 92-BABCO FAX: (510) 412-8940
(510) 412-8930
http://www.babco.com

Bacharach
625 Alpha Drive
Pittsburgh, PA 15238
(800) 736-4666 FAX: (412) 963-2091
(412) 963-2000
http://www.bacharach-inc.com

Bachem Bioscience
3700 Horizon Drive
King of Prussia, PA 19406
(800) 634-3183 FAX: (610) 239-0800
(610) 239-0300
http://www.bachem.com

Bachem California
3132 Kashiwa Street
P.O. Box 3426
Torrance, CA 90510
(800) 422-2436 FAX: (310) 530-1571
(310) 539-4171
http://www.bachem.com

Baekon
18866 Allendale Avenue
Saratoga, CA 95070
(408) 972-8779 FAX: (408) 741-0944

Baker Chemical
See J.T. Baker

Bangs Laboratories
9025 Technology Drive
Fishers, IN 46038
(317) 570-7020 FAX: (317) 570-7034
http://www.bangslabs.com

Bard Parker
See Becton Dickinson

Barnstead/Thermolyne
P.O. Box 797
2555 Kerper Boulevard
Dubuque, IA 52004
(800) 446-6060 FAX: (319) 589-0516
http://www.barnstead.com

Barrskogen
4612 Laverock Place N
Washington, DC 20007
(800) 237-9192 FAX: (301) 464-7347

BAS
See Bioanalytical Systems

BASF
Specialty Products
3000 Continental Drive North
Mt. Olive, NJ 07828
(800) 669-2273 FAX: (973) 426-2610
http://www.basf.com

Baum, W.A.
620 Oak Street
Copiague, NY 11726
(631) 226-3940 FAX: (631) 226-3969
http://www.wabaum.com

Bausch & Lomb
One Bausch & Lomb Place
Rochester, NY 14604
(800) 344-8815 FAX: (716) 338-6007
(716) 338-6000
http://www.bausch.com

Baxter
Fenwal Division
1627 Lake Cook Road
Deerfield, IL 60015
(800) 766-1077 FAX: (800) 395-3291
(847) 940-6599 FAX: (847) 940-5766
http://www.powerfulmedicine.com

Baxter Healthcare
One Baxter Parkway
Deerfield, IL 60015
(800) 777-2298 FAX: (847) 948-3948
(847) 948-2000
http://www.baxter.com

Baxter Scientific Products
See VWR Scientific

Bayer
Agricultural Division
Animal Health Products
12707 Shawnee Mission Pkwy.
Shawnee Mission, KS 66201
(800) 255-6517 FAX: (913) 268-2803
(913) 268-2000
http://www.bayerus.com

Bayer
Diagnostics Division (Order Services)
P.O. Box 2009
Mishiwaka, IN 46546
(800) 248-2637 FAX: (800) 863-6882
(219) 256-3390
http://www.bayer.com

Bayer Diagnostics
511 Benedict Avenue
Tarrytown, NY 10591
(800) 255-3232 FAX: (914) 524-2132
(914) 631-8000
http://www.bayerdiag.com

Bayer Plc
Diagnostics Division
Bayer House, Strawberry Hill
Newbury, Berkshire RG14 1JA, UK
(44) 1635-563000
FAX: (44) 1635-563393
http://www.bayer.co.uk

BD Immunocytometry Systems
2350 Qume Drive
San Jose, CA 95131
(800) 223-8226 FAX: (408) 954-BDIS
http://www.bdfacs.com

BD Labware
Two Oak Park
Bedford, MA 01730
(800) 343-2035 FAX: (800) 743-6200
http://www.bd.com/labware

BD PharMingen
10975 Torreyana Road
San Diego, CA 92121
(800) 848-6227 FAX: (858) 812-8888
(858) 812-8800
http://www.pharmingen.com

BD Transduction Laboratories
133 Venture Court
Lexington, KY 40511
(800) 227-4063 FAX: (606) 259-1413
(606) 259-1550
http://www.translab.com

BDH Chemicals
Broom Road
Poole, Dorset BH12 4NN, UK
(44) 1202-745520
FAX: (44) 1202- 2413720

BDH Chemicals
See Hoefer Scientific Instruments

BDIS
See BD Immunocytometry Systems

Beckman Coulter
4300 North Harbor Boulevard
Fullerton, CA 92834
(800) 233-4685 FAX: (800) 643-4366
(714) 871-4848
http://www.beckman-coulter.com

Beckman Instruments
Spinco Division/Bioproducts Operation
1050 Page Mill Road
Palo Alto, CA 94304
(800) 742-2345 FAX: (415) 859-1550
(415) 857-1150
http://www.beckman-coulter.com

Becton Dickinson Immunocytometry & Cellular Imaging
2350 Qume Drive
San Jose, CA 95131
(800) 223-8226 FAX: (408) 954-2007
(408) 432-9475
http://www.bdfacs.com

Becton Dickinson Labware
1 Becton Drive
Franklin Lakes, NJ 07417
(888) 237-2762 FAX: (800) 847-2220
(201) 847-4222
http://www.bdfacs.com

Becton Dickinson Labware
2 Bridgewater Lane
Lincoln Park, NJ 07035
(800) 235-5953 FAX: (800) 847-2220
(201) 847-4222
http://www.bdfacs.com

Becton Dickinson Primary
Care Diagnostics
7 Loveton Circle
Sparks, MD 21152
(800) 675-0908 FAX: (410) 316-4723
(410) 316-4000
http://www.bdfacs.com

Behringwerke Diagnostika
Hoechster Strasse 70
P-65835 Liederback, Germany
(49) 69-30511 FAX: (49) 69-303-834

Bellco Glass
340 Edrudo Road
Vineland, NJ 08360
(800) 257-7043 FAX: (856) 691-3247
(856) 691-1075
http://www.bellcoglass.com

Bender Biosystems
See Serva

Beral Enterprises
See Garren Scientific

Berkeley Antibody
See BAbCO

Bernsco Surgical Supply
25 Plant Avenue
Hauppague, NY 11788
(800) TIEMANN FAX: (516) 273-6199
(516) 273-0005
http://www.bernsco.com

Beta Medical and Scientific
(Datesand Ltd.)
2 Ferndale Road
Sale, Manchester M33 3GP, UK
(44) 1612 317676
FAX: (44) 1612 313656

Bethesda Research Laboratories (BRL)
See Life Technologies

Biacore
200 Centennial Avenue, Suite 100
Piscataway, NJ 08854
(800) 242-2599 FAX: (732) 885-5669
(732) 885-5618
http://www.biacore.com

Bilaney Consultants
St. Julian's
Sevenoaks, Kent TN15 0RX, UK
(44) 1732 450002
FAX: (44) 1732 450003
http://www.bilaney.com

Binding Site
5889 Oberlin Drive, Suite 101
San Diego, CA 92121
(800) 633-4484 FAX: (619) 453-9189
(619) 453-9177
http://www.bindingsite.co.uk

BIO 101
See Qbiogene

Bio Image
See Genomic Solutions

Bioanalytical Systems
2701 Kent Avenue
West Lafayette, IN 47906
(800) 845-4246 FAX: (765) 497-1102
(765) 463-4527
http://www.bioanalytical.com

Biocell
2001 University Drive
Rancho Dominguez, CA 90220
(800) 222-8382 FAX: (310) 637-3927
(310) 537-3300
http://www.biocell.com

Biocoat
See BD Labware

BioComp Instruments
650 Churchill Road
Fredericton, New Brunswick
E3B 1P6 Canada
(800) 561-4221 FAX: (506) 453-3583
(506) 453-4812
http://131.202.97.21

BioDesign
P.O. Box 1050
Carmel, NY 10512
(914) 454-6610 FAX: (914) 454-6077
http://www.biodesignofny.com

BioDiscovery
4640 Admiralty Way, Suite 710
Marina Del Rey, CA 90292
(310) 306-9310 FAX: (310) 306-9109
http://www.biodiscovery.com

Bioengineering AG
Sagenrainstrasse 7
CH8636 Wald, Switzerland
(41) 55-256-8-111
FAX: (41) 55-256-8-256

Biofluids
Division of Biosource International
1114 Taft Street
Rockville, MD 20850
(800) 972-5200 FAX: (301) 424-3619
(301) 424-4140
http://www.biosource.com

BioFX Laboratories
9633 Liberty Road, Suite S
Randallstown, MD 21133
(800) 445-6447 FAX: (410) 498-6008
(410) 496-6006
http://www.biofx.com

BioGenex Laboratories
4600 Norris Canyon Road
San Ramon, CA 94583
(800) 421-4149 FAX: (925) 275-0580
(925) 275-0550
http://www.biogenex.com

Bioline
2470 Wrondel Way
Reno, NV 89502
(888) 257-5155 FAX: (775) 828-7676
(775) 828-0202
http://www.bioline.com

Bio-Logic Research & Development
1, rue de l-Europe
A.Z. de Font-Ratel
38640 CLAIX, France
(33) 76-98-68-31
FAX: (33) 76-98-69-09

Biological Detection Systems
See Cellomics or Amersham

Biomeda
1166 Triton Drive, Suite E
P.O. Box 8045
Foster City, CA 94404
(800) 341-8787 FAX: (650) 341-2299
(650) 341-8787
http://www.biomeda.com

BioMedic Data Systems
1 Silas Road
Seaford, DE 19973
(800) 526-2637 FAX: (302) 628-4110
(302) 628-4100
http://www.bmds.com

Biomedical Engineering
P.O. Box 980694
Virginia Commonwealth University
Richmond, VA 23298
(804) 828-9829 FAX: (804) 828-1008

Biomedical Research Instruments
12264 Wilkins Avenue
Rockville, MD 20852
(800) 327-9498
(301) 881-7911
http://www.biomedinstr.com

Bio/medical Specialties
P.O. Box 1687
Santa Monica, CA 90406
(800) 269-1158 FAX: (800) 269-1158
(323) 938-7515

BioMerieux
100 Rodolphe Street
Durham, North Carolina 27712
(919) 620-2000
http://www.biomerieux.com

BioMetallics
P.O. Box 2251
Princeton, NJ 08543
(800) 999-1961 FAX: (609) 275-9485
(609) 275-0133
http://www.microplate.com

Biomol Research Laboratories
5100 Campus Drive
Plymouth Meeting, PA 19462
(800) 942-0430 FAX: (610) 941-9252
(610) 941-0430
http://www.biomol.com

Bionique Testing Labs
Fay Brook Drive
RR 1, Box 196
Saranac Lake, NY 12983
(518) 891-2356 FAX: (518) 891-5753
http://www.bionique.com

Biopac Systems
42 Aero Camino
Santa Barbara, CA 93117
(805) 685-0066 FAX: (805) 685-0067
http://www.biopac.com

Bioproducts for Science
See Harlan Bioproducts for Science

Bioptechs
3560 Beck Road
Butler, PA 16002
(877) 548-3235 FAX: (724) 282-0745
(724) 282-7145
http://www.bioptechs.com

BIOQUANT-R&M Biometrics
5611 Ohio Avenue
Nashville, TN 37209
(800) 221-0549 (615) 350-7866
FAX: (615) 350-7282
http://www.bioquant.com

Bio-Rad Laboratories
2000 Alfred Nobel Drive
Hercules, CA 94547
(800) 424-6723 FAX: (800) 879-2289
(510) 741-1000 FAX: (510) 741-5800
http://www.bio-rad.com

Bio-Rad Laboratories
Maylands Avenue
Hemel Hempstead, Herts HP2 7TD, UK
http://www.bio-rad.com

Bioreclamation
492 Richmond Road
East Meadow, NY 11554
(516) 483-1196 FAX: (516) 483-4683
http://www.bioreclamation.com

BioRobotics
3-4 Bennell Court
Comberton, Cambridge CB3 7DS, UK
(44) 1223-264345
FAX: (44) 1223-263933
http://www.biorobotics.co.uk

BIOS Laboratories
See Genaissance Pharmaceuticals

Biosearch Technologies
81 Digital Drive
Novato, CA 94949
(800) GENOME1 FAX: (415) 883-8488
(415) 883-8400
http://www.biosearchtech.com

BioSepra
111 Locke Drive
Marlborough, MA 01752
(800) 752-5277 FAX: (508) 357-7595
(508) 357-7500
http://www.biosepra.com

Bio-Serv
1 8th Street, Suite 1
Frenchtown, NJ 08825
(908) 996-2155 FAX: (908) 996-4123
http://www.bio-serv.com

BioSignal
1744 William Street, Suite 600
Montreal, Quebec
H3J 1R4 Canada
(800) 293-4501 FAX: (514) 937-0777
(514) 937-1010
http://www.biosignal.com

Biosoft
P.O. Box 10938
Ferguson, MO 63135
(314) 524-8029 FAX: (314) 524-8129
http://www.biosoft.com

Biosource International
820 Flynn Road
Camarillo, CA 93012
(800) 242-0607 FAX: (805) 987-3385
(805) 987-0086
http://www.biosource.com

BioSpec Products
P.O. Box 788
Bartlesville, OK 74005
(800) 617-3363 FAX: (918) 336-3363
(918) 336-3363
http://www.biospec.com

Biosure
See Riese Enterprises

Biosym Technologies
See Molecular Simulations

Biosys
21 quai du Clos des Roses
602000 Compiegne, France
(33) 03 4486 2275
FAX: (33) 03 4484 2297

Bio-Tech Research Laboratories
NIAID Repository
Rockville, MD 20850
http://www.niaid.nih.gov/ncn/repos.htm

Biotech Instruments
Biotech House
75A High Street
Kimpton, Hertfordshire SG4 8PU, UK
(44) 1438 832555
FAX: (44) 1438 833040
http://www.biotinst.demon.co.uk

Biotech International
11 Durbell Street
Acacia Ridge, Queensland 4110
Australia
61-7-3370-6396
FAX: 61-7-3370-6370
http://www.avianbiotech.com

Biotech Source
Inland Farm Drive
South Windham, ME 04062
(207) 892-3266 FAX: (207) 892-6774

Bio-Tek Instruments
Highland Industrial Park
P.O. Box 998
Winooski, VT 05404
(800) 451-5172 FAX: (802) 655-7941
(802) 655-4040
http://www.biotek.com

Biotecx Laboratories
6023 South Loop East
Houston, TX 77033
(800) 535-6286 FAX: (713) 643-3143
(713) 643-0606
http://www.biotecx.com

BioTherm
3260 Wilson Boulevard
Arlington, VA 22201
(703) 522-1705 FAX: (703) 522-2606

Bioventures
P.O. Box 2561
848 Scott Street
Murfreesboro, TN 37133
(800) 235-8938 FAX: (615) 896-4837
http://www.bioventures.com

BioWhittaker
8830 Biggs Ford Road
P.O. Box 127
Walkersville, MD 21793
(800) 638-8174 FAX: (301) 845-8338
(301) 898-7025
http://www.biowhittaker.com

Biozyme Laboratories
9939 Hibert Street, Suite 101
San Diego, CA 92131
(800) 423-8199 FAX: (858) 549-0138
(858) 549-4484
http://www.biozyme.com

Bird Products
1100 Bird Center Drive
Palm Springs, CA 92262
(800) 328-4139 FAX: (760) 778-7274
(760) 778-7200
http://www.birdprod.com/bird

B & K Universal
2403 Yale Way
Fremont, CA 94538
(800) USA-MICE FAX: (510) 490-3036

BLS Ltd.
Zselyi Aladar u. 31
1165 Budapest, Hungary
(36) 1-407-2602 FAX: (36) 1-407-2896
http://www.bls-ltd.com

Blue Sky Research
3047 Orchard Parkway
San Jose, CA 95134
(408) 474-0988 FAX: (408) 474-0989
http://www.blueskyresearch.com

Blumenthal Industries
7 West 36th Street, 13th floor
New York, NY 10018
(212) 719-1251 FAX: (212) 594-8828

BOC Edwards
One Edwards Park
301 Ballardvale Street
Wilmington, MA 01887
(800) 848-9800 FAX: (978) 658-7969
(978) 658-5410
http://www.bocedwards.com

Boehringer Ingelheim
900 Ridgebury Road
P.O. Box 368
Ridgefield, CT 06877
(800) 243-0127 FAX: (203) 798-6234
(203) 798-9988
http://www.boehringer-ingelheim.com

Boehringer Mannheim
Biochemicals Division
See Roche Diagnostics

Boekel Scientific
855 Pennsylvania Boulevard
Feasterville, PA 19053
(800) 336-6929 FAX: (215) 396-8264
(215) 396-8200
http://www.boekelsci.com

Bohdan Automation
1500 McCormack Boulevard
Mundelein, IL 60060
(708) 680-3939 FAX: (708) 680-1199

BPAmoco
4500 McGinnis Ferry Road
Alpharetta, GA 30005
(800) 328-4537 FAX: (770) 772-8213
(770) 772-8200
http://www.bpamoco.com

Brain Research Laboratories
Waban P.O. Box 88
Newton, MA 02468
(888) BRL-5544 FAX: (617) 965-6220
(617) 965-5544
http://www.brainresearchlab.com

Braintree Scientific
P.O. Box 850929
Braintree, MA 02185
(781) 843-1644 FAX: (781) 982-3160
http://www.braintreesci.com

Brandel
8561 Atlas Drive
Gaithersburg, MD 20877
(800) 948-6506 FAX: (301) 869-5570
(301) 948-6506
http://www.brandel.com

Branson Ultrasonics
41 Eagle Road
Danbury, CT 06813
(203) 796-0400 FAX: (203) 796-9838
http://www.plasticsnet.com/branson

B. Braun Biotech
999 Postal Road
Allentown, PA 18103
(800) 258-9000 FAX: (610) 266-9319
(610) 266-6262
http://www.bbraunbiotech.com

B. Braun Biotech International
Schwarzenberg Weg 73-79
P.O. Box 1120
D-34209 Melsungen, Germany
(49) 5661-71-3400
FAX: (49) 5661-71-3702
http://www.bbraunbiotech.com

B. Braun-McGaw
2525 McGaw Avenue
Irvine, CA 92614
(800) BBRAUN-2 (800) 624-2963
http://www.bbraunusa.com

B. Braun Medical
Thorncliffe Park
Sheffield S35 2PW, UK
(44) 114-225-9000
FAX: (44) 114-225-9111
http://www.bbmuk.demon.co.uk

Brenntag
P.O. Box 13788
Reading, PA 19612-3788
(610) 926-4151 FAX: (610) 926-4160
http://www.brenntagnortheast.com

Bresatec
See GeneWorks

Bright/Hacker Instruments
17 Sherwood Lane
Fairfield, NJ 07004
(973) 226-8450 FAX: (973) 808-8281
http://www.hackerinstruments.com

Brinkmann Instruments
Subsidiary of Sybron
1 Cantiague Road
P.O. Box 1019
Westbury, NY 11590
(800) 645-3050 FAX: (516) 334-7521
(516) 334-7500
http://www.brinkmann.com

Bristol-Meyers Squibb
P.O. Box 4500
Princeton, NJ 08543
(800) 631-5244 FAX: (800) 523-2965
http://www.bms.com

Broadley James
19 Thomas
Irvine, CA 92618
(800) 288-2833 FAX: (949) 829-5560
(949) 829-5555
http://www.broadleyjames.com

Brookhaven Instruments
750 Blue Point Road
Holtsville, NY 11742
(631) 758-3200 FAX: (631) 758-3255
http://www.bic.com

Brownlee Labs
See Applied Biosystems
Distributed by Pacer Scientific

Bruel & Kjaer
Division of Spectris Technologies
2815 Colonnades Court
Norcross, GA 30071
(800) 332-2040 FAX: (770) 847-8440
(770) 209-6907
http://www.bkhome.com

Bruker Analytical X-Ray Systems
5465 East Cheryl Parkway
Madison, WI 53711
(800) 234-XRAY FAX: (608) 276-3006
(608) 276-3000
http://www.bruker-axs.com

Bruker Instruments
19 Fortune Drive
Billerica, MA 01821
(978) 667-9580 FAX: (978) 667-0985
http://www.bruker.com

BTX
Division of Genetronics
11199 Sorrento Valley Road
San Diego, CA 92121
(800) 289-2465 FAX: (858) 597-9594
(858) 597-6006
http://www.genetronics.com/btx

Buchler Instruments
See Baxter Scientific Products

Buckshire
2025 Ridge Road
Perkasie, PA 18944
(215) 257-0116

Burdick and Jackson
Division of Baxter Scientific Products
1953 S. Harvey Street
Muskegon, MI 49442
(800) 368-0050 FAX: (231) 728-8226
(231) 726-3171
http://www.bandj.com/mainframe.htm

Burleigh Instruments
P.O. Box E
Fishers, NY 14453
(716) 924-9355 FAX: (716) 924-9072
http://www.burleigh.com

Burns Veterinary Supply
1900 Diplomat Drive
Farmer's Branch, TX 75234
(800) 92-BURNS FAX: (972) 243-6841
http://www.burnsvet.com

Burroughs Wellcome
See Glaxo Wellcome

The Butler Company
5600 Blazer Parkway
Dublin, OH 43017
(800) 551-3861 FAX: (614) 761-9096
(614) 761-9095
http://www.wabutler.com

Butterworth Laboratories
54-56 Waldegrave Road
Teddington, Middlesex
TW11 8LG, UK
(44)(0)20-8977-0750
FAX: (44)(0)28-8943-2624
http://www.butterworth-labs.co.uk

Buxco Electronics
95 West Wood Road #2
Sharon, CT 06069
(860) 364-5558 FAX: (860) 364-5116
http://www.buxco.com

C/D/N Isotopes
88 Leacock Street
Pointe-Claire, Quebec
H9R 1H1 Canada
(800) 697-6254 FAX: (514) 697-6148

C.M.A./Microdialysis AB
73 Princeton Street
North Chelmsford, MA 01863
(800) 440-4980 FAX: (978) 251-1950
(978) 251-1940
http://www.microdialysis.com

Calbiochem-Novabiochem
P.O. Box 12087-2087
La Jolla, CA 92039
(800) 854-3417 FAX: (800) 776-0999
(858) 450-9600
http://www.calbiochem.com

California Fine Wire
338 South Fourth Street
Grover Beach, CA 93433
(805) 489-5144 FAX: (805) 489-5352
http://www.calfinewire.com

Calorimetry Sciences
155 West 2050 North
Spanish Fork, UT 84660
(801) 794-2600 FAX: (801) 794-2700
http://www.calscorp.com

Caltag Laboratories
1849 Bayshore Highway, Suite 200
Burlingame, CA 94010
(800) 874-4007 FAX: (650) 652-9030
(650) 652-0468
http://www.caltag.com

Cambridge Electronic Design
Science Park, Milton Road
Cambridge CB4 0FE, UK
44 (0) 1223-420-186
FAX: 44 (0) 1223-420-488
http://www.ced.co.uk

Cambridge Isotope Laboratories
50 Frontage Road
Andover, MA 01810
(800) 322-1174 FAX: (978) 749-2768
(978) 749-8000
http://www.isotope.com

Cambridge Research Biochemicals
See Zeneca/CRB

Cambridge Technology
109 Smith Place
Cambridge, MA 02138
(6l7) 441-0600 FAX: (617) 497-8800
http://www.camtech.com

Camlab
Nuffield Road
Cambridge CB4 1TH, UK
(44) 122-3424222
FAX: (44) 122-3420856
http://www.camlab.co.uk/home.htm

Campden Instruments
Park Road
Sileby Loughborough
Leicestershire LE12 7TU, UK
(44) 1509-814790
FAX: (44) 1509-816097
http://www.campden-inst.com/home.htm

Cappel Laboratories
See Organon Teknika Cappel

Carl Roth GmgH & Company
Schoemperlenstrasse 1-5
76185 Karlsrube
Germany
(49) 72-156-06164
FAX: (49) 72-156-06264
http://www.carl-roth.de

Carl Zeiss
One Zeiss Drive
Thornwood, NY 10594
(800) 233-2343 FAX: (914) 681-7446
(914) 747-1800
http://www.zeiss.com

Carlo Erba Reagenti
Via Winckelmann 1
20148 Milano
Lombardia, Italy
(39) 0-29-5231
FAX: (39) 0-29-5235-904
http://www.carloerbareagenti.com

Carolina Biological Supply
2700 York Road
Burlington, NC 27215
(800) 334-5551 FAX: (336) 584-76869
(336) 584-0381
http://www.carolina.com

Carolina Fluid Components
9309 Stockport Place
Charlotte, NC 28273
(704) 588-6101 FAX: (704) 588-6115
http://www.cfcsite.com

Cartesian Technologies
17851 Skypark Circle, Suite C
Irvine, CA 92614
(800) 935-8007
http://cartesiantech.com

Cayman Chemical
1180 East Ellsworth Road
Ann Arbor, MI 48108
(800) 364-9897 FAX: (734) 971-3640
(734) 971-3335
http://www.caymanchem.com

CB Sciences
One Washington Street, Suite 404
Dover, NH 03820
(800) 234-1757 FAX: (603) 742-2455
http://www.cbsci.com

CBS Scientific
P.O. Box 856
Del Mar, CA 92014
(800) 243-4959 FAX: (858) 755-0733
(858) 755-4959
http://www.cbssci.com

CCR (Coriell Cell Repository)
See Coriell Institute for Medical Research

CE Instruments
Grand Avenue Parkway
Austin, TX 78728
(800) 876-6711 FAX: (512) 251-1597
http://www.ceinstruments.com

Cedarlane Laboratories
5516 8th Line, R.R. #2
Hornby, Ontario
L0P 1E0 Canada
(905) 878-8891 FAX: (905) 878-7800
http://www.cedarlanelabs.com

CEL Associates
P.O. Box 721854
Houston, TX 77272
(800) 537-9339 FAX: (281) 933-0922
(281) 933-9339
http://www.cel-1.com

Cel-Line Associates
See Erie Scientific

Celite World Minerals
130 Castilian Drive
Santa Barbara, CA 93117
(805) 562-0200 FAX: (805) 562-0299
http://www.worldminerals.com/celite

Cell Genesys
342 Lakeside Drive
Foster City, CA 94404
(650) 425-4400 FAX: (650) 425-4457
http://www.cellgenesys.com

Cell Signaling Technology
166B Cummings Center
Beverly, MA 01915
(877) 616-CELL FAX: (978) 867-2388
(978) 867-2488
http://www.cellsignal.com

Cell Systems
12815 NE 124th Street, Suite A
Kirkland, WA 98034
(800) 697-1211 FAX: (425) 820-6762
(425) 823-1010

Cellmark Diagnostics
20271 Goldenrod Lane
Germantown, MD 20876
(800) 872-5227 FAX: (301) 428-4877
(301) 428-4980
http://www.cellmark-labs.com

Cellomics
635 William Pitt Way
Pittsburgh, PA 15238
(888) 826-3857 FAX: (412) 826-3850
(412) 826-3600
http://www.cellomics.com

Celltech
216 Bath Road
Slough, Berkshire SL1 4EN, UK
(44) 1753 534655
FAX: (44) 1753 536632
http://www.celltech.co.uk

Cellular Products
872 Main Street
Buffalo, NY 14202
(800) CPI-KITS FAX: (716) 882-0959
(716) 882-0920
http://www.zeptometrix.com

CEM
P.O. Box 200
Matthews, NC 28106
(800) 726-3331

Centers for Disease Control
1600 Clifton Road NE
Atlanta, GA 30333
(800) 311-3435 FAX: (888) 232-3228
(404) 639-3311
http://www.cdc.gov

CERJ
Centre d'Elevage Roger Janvier
53940 Le Genest Saint Isle
France

Cetus
See Chiron

Chance Propper
Warly, West Midlands B66 1NZ, UK
(44)(0)121-553-5551
FAX: (44)(0)121-525-0139

Charles River Laboratories
251 Ballardvale Street
Wilmington, MA 01887
(800) 522-7287 FAX: (978) 658-7132
(978) 658-6000
http://www.criver.com

Charm Sciences
36 Franklin Street
Malden, MA 02148
(800) 343-2170 FAX: (781) 322-3141
(781) 322-1523
http://www.charm.com

Chase-Walton Elastomers
29 Apsley Street
Hudson, MA 01749
(800) 448-6289 FAX: (978) 562-5178
(978) 568-0202
http://www.chase-walton.com

ChemGenes
Ashland Technology Center
200 Homer Avenue
Ashland, MA 01721
(800) 762-9323 FAX: (508) 881-3443
(508) 881-5200
http://www.chemgenes.com

Chemglass
3861 North Mill Road
Vineland, NJ 08360
(800) 843-1794 FAX: (856) 696-9102
(800) 696-0014
http://www.chemglass.com

Chemicon International
28835 Single Oak Drive
Temecula, CA 92590
(800) 437-7500 FAX: (909) 676-9209
(909) 676-8080
http://www.chemicon.com

Chem-Impex International
935 Dillon Drive
Wood Dale, IL 60191
(800) 869-9290 FAX: (630) 766-2218
(630) 766-2112
http://www.chemimpex.com

Chem Service
P.O. Box 599
West Chester, PA 19381-0599
(610) 692-3026 FAX: (610) 692-8729
http://www.chemservice.com

Chemsyn Laboratories
13605 West 96th Terrace
Lenexa, KS 66215
(913) 541-0525 FAX: (913) 888-3582
http://www.tech.epcorp.com/ChemSyn/chemsyn.htm

Chemunex USA
1 Deer Park Drive, Suite H-2
Monmouth Junction, NJ 08852
(800) 411-6734
http://www.chemunex.com

Cherwell Scientific Publishing
The Magdalen Centre
Oxford Science Park
Oxford OX44GA, UK
(44)(1) 865-784-800
FAX: (44)(1) 865-784-801
http://www.cherwell.com

ChiRex Cauldron
383 Phoenixville Pike
Malvern, PA 19355
(610) 727-2215 FAX: (610) 727-5762
http://www.chirex.com

Chiron Diagnostics
See Bayer Diagnostics

Chiron Mimotopes Peptide Systems
See Multiple Peptide Systems

Chiron
4560 Horton Street
Emeryville, CA 94608
(800) 244-7668 FAX: (510) 655-9910
(510) 655-8730
http://www.chiron.com

Chrom Tech
P.O. Box 24248
Apple Valley, MN 55124
(800) 822-5242 FAX: (952) 431-6345
http://www.chromtech.com

Chroma Technology
72 Cotton Mill Hill, Unit A-9
Brattleboro, VT 05301
(800) 824-7662 FAX: (802) 257-9400
(802) 257-1800
http://www.chroma.com

Chromatographie
ZAC de Moulin No. 2
91160 Saulx les Chartreux
France
(33) 01-64-54-8969
FAX: (33) 01-69-0988091
http://www.chromatographie.com

Chromogenix
Taljegardsgatan 3
431-53 Mlndal, Sweden
(46) 31-706-20-70
FAX: (46) 31-706-20-80
http://www.chromogenix.com

Chrompack USA
c/o Varian USA
2700 Mitchell Drive
Walnut Creek, CA 94598
(800) 526-3687 FAX: (925) 945-2102
(925) 939-2400
http://www.chrompack.com

Chugai Biopharmaceuticals
6275 Nancy Ridge Drive
San Diego, CA 92121
(858) 535-5900 FAX: (858) 546-5973
http://www.chugaibio.com

Ciba-Corning Diagnostics
See Bayer Diagnostics

Ciba-Geigy
See Ciba Specialty Chemicals or Novartis Biotechnology

Ciba Specialty Chemicals
540 White Plains Road
Tarrytown, NY 10591
(800) 431-1900 FAX: (914) 785-2183
(914) 785-2000
http://www.cibasc.com

Ciba Vision
Division of Novartis AG
11460 Johns Creek Parkway
Duluth, GA 30097
(770) 476-3937
http://www.cvworld.com

Cidex
Advanced Sterilization Products
33 Technology Drive
Irvine, CA 92618
(800) 595-0200 (949) 581-5799
http://www.cidex.com/ASPnew.htm

Cinna Scientific
Subsidiary of Molecular Research Center
5645 Montgomery Road
Cincinnati, OH 45212
(800) 462-9868 FAX: (513) 841-0080
(513) 841-0900
http://www.mrcgene.com

Cistron Biotechnology
10 Bloomfield Avenue
Pine Brook, NJ 07058
(800) 642-0167 FAX: (973) 575-4854
(973) 575-1700
http://www.cistronbio.com

Clark Electromedical Instruments
See Harvard Apparatus

Clay Adam
See Becton Dickinson Primary Care Diagnostics

CLB (Central Laboratory of the Netherlands)
Blood Transfusion Service
P.O. Box 9190
1006 AD Amsterdam, The Netherlands
(31) 20-512-9222
FAX: (31) 20-512-3332

Cleveland Scientific
P.O. Box 300
Bath, OH 44210
(800) 952-7315 FAX: (330) 666-2240
http::/www.clevelandscientific.com

Clonetics
Division of BioWhittaker
http://www.clonetics.com
Also see BioWhittaker

Clontech Laboratories
1020 East Meadow Circle
Palo Alto, CA 94303
(800) 662-2566 FAX: (800) 424-1350
(650) 424-8222 FAX: (650) 424-1088
http://www.clontech.com

Closure Medical Corporation
5250 Greens Dairy Road
Raleigh, NC 27616
(919) 876-7800 FAX: (919) 790-1041
http://www.closuremed.com

CMA Microdialysis AB
73 Princeton Street
North Chelmsford, MA 01863
(800) 440-4980 FAX: (978) 251-1950
(978) 251 1940
http://www.microdialysis.com

Cocalico Biologicals
449 Stevens Road
P.O. Box 265
Reamstown, PA 17567
(717) 336-1990 FAX: (717) 336-1993

Coherent Laser
5100 Patrick Henry Drive
Santa Clara, CA 95056
(800) 227-1955 FAX: (408) 764-4800
(408) 764-4000
http://www.cohr.com

Cohu
P.O. Box 85623
San Diego, CA 92186
(858) 277-6700 FAX: (858) 277-0221
http://www.COHU.com/cctv

Cole-Parmer Instrument
625 East Bunker Court
Vernon Hills, IL 60061
(800) 323-4340 FAX: (847) 247-2929
(847) 549-7600
http://www.coleparmer.com

Collaborative Biomedical Products
and **Collaborative Research**
See Becton Dickinson Labware

Collagen Aesthetics
1850 Embarcadero Road
Palo Alto, CA 94303
(650) 856-0200 FAX: (650) 856-0533
http://www.collagen.com

Collagen Corporation
See Collagen Aesthetics

College of American Pathologists
325 Waukegan Road
Northfield, IL 60093
(800) 323-4040 FAX: (847) 832-8000
(847) 446-8800
http://www.cap.org/index.cfm

Colonial Medical Supply
504 Wells Road
Franconia, NH 03580
(603) 823-9911 FAX: (603) 823-8799
http://www.colmedsupply.com

Colorado Serum
4950 York Street
Denver, CO 80216
(800) 525-2065 FAX: (303) 295-1923
http://www.colorado-serum.com

Columbia Diagnostics
8001 Research Way
Springfield, VA 22153
(800) 336-3081 FAX: (703) 569-2353
(703) 569-7511
http://www.columbiadiagnostics.com

Columbus Instruments
950 North Hague Avenue
Columbus, OH 43204
(800) 669-5011 FAX: (614) 276-0529
(614) 276-0861
http://www.columbusinstruments.com

Compu Cyte Corp.
12 Emily Street
Cambridge, MA 02139
(800) 840-1303 FAX: (617) 577-4501
(617) 492-1300
http://www.compucyte.com

Compugen
25 Leek Crescent
Richmond Hill, Ontario
L4B 4B3 Canada
800-387-5045 FAX: (905) 707-2020
(905) 707-2000
http://www.compugen.com/locations.htm

Computer Associates International
One Computer Associates Plaza
Islandia, NY 11749
(631) 342-6000 FAX: (631) 342-6800
http://www.cai.com

Connaught Laboratories
See Aventis Pasteur

Connectix
2955 Campus Drive, Suite 100
San Mateo, CA 94403
(800) 950-5880 FAX: (650) 571-0850
(650) 571-5100
http://www.connectix.com

Contech
99 Hartford Avenue
Providence, RI 02909
(401) 351-4890 FAX: (401) 421-5072
http://www.iol.ie/~burke/contech.html

Continental Laboratory Products
5648 Copley Drive
San Diego, CA 92111
(800) 456-7741 FAX: (858) 279-5465
(858) 279-5000
http://www.conlab.com

ConvaTec
Professional Services
P.O. Box 5254
Princeton, NJ 08543
(800) 422-8811
http://www.convatec.com

Cooper Instruments & Systems
P.O. Box 3048
Warrenton, VA 20188
(800) 344-3921 FAX: (540) 347-4755
(540) 349-4746
http://www.cooperinstruments.com

Cooperative Human Tissue Network
(866) 462-2486
http://www.chtn.ims.nci.nih.gov

Cora Styles Needles 'N Blocks
56 Milton Street
Arlington, MA 02474
(781) 648-6289 FAX: (781) 641-7917

Coriell Cell Repository (CCR)
See Coriell Institute for Medical Research

Coriell Institute for Medical Research
Human Genetic Mutant Repository
401 Haddon Avenue
Camden, NJ 08103
(856) 966-7377 FAX: (856) 964-0254
http://arginine.umdnj.edu

Corion
8 East Forge Parkway
Franklin, MA 02038
(508) 528-4411 FAX: (508) 520-7583
(800) 598-6783
http://www.corion.com

Corning and
Corning Science Products
P.O. Box 5000
Corning, NY 14831
(800) 222-7740 FAX: (607) 974-0345
(607) 974-9000
http://www.corning.com

Costar
See Corning

Coulbourn Instruments
7462 Penn Drive
Allentown, PA 18106
(800) 424-3771 FAX: (610) 391-1333
(610) 395-3771
http://www.coulbourninst.com

Coulter Cytometry
See Beckman Coulter

Covance Research Products
465 Swampbridge Road
Denver, PA 17517
(800) 345-4114 FAX: (717) 336-5344
(717) 336-4921
http://www.covance.com

Coy Laboratory Products
14500 Coy Drive
Grass Lake, MI 49240
(734) 475-2200 FAX: (734) 475-1846
http://www.coylab.com

CPG
3 Borinski Road
Lincoln Park, NJ 07035
(800) 362-2740 FAX: (973) 305-0884
(973) 305-8181
http://www.cpg-biotech.com

CPL Scientific
43 Kingfisher Court
Hambridge Road
Newbury RG14 5SJ, UK
(44) 1635-574902
FAX: (44) 1635-529322
http://www.cplscientific.co.uk

CraMar Technologies
8670 Wolff Court, #160
Westminster, CO 80030
(800) 4-TOMTEC
http://www.cramar.com

Crescent Chemical
1324 Motor Parkway
Hauppauge, NY 11788
(800) 877-3225 FAX: (631) 348-0913
(631) 348-0333
http://www.creschem.com

Crist Instrument
P.O. Box 128
10200 Moxley Road
Damascus, MD 20872
(301) 253-2184 FAX: (301) 253-0069
http://www.cristinstrument.com

Cruachem
See Annovis
http://www.cruachem.com

CS Bio
1300 Industrial Road
San Carlos, CA 94070
(800) 627-2461 FAX: (415) 802-0944
(415) 802-0880
http://www.csbio.com

CS-Chromatographie Service
Am Parir 27
D-52379 Langerwehe, Germany
(49) 2423-40493-0
FAX: (49) 2423-40493-49
http://www.cs-chromatographie.de

Cuno
400 Research Parkway
Meriden, CT 06450
(800) 231-2259 FAX: (203) 238-8716
(203) 237-5541
http://www.cuno.com

Curtin Matheson Scientific
9999 Veterans Memorial Drive
Houston, TX 77038
(800) 392-3353 FAX: (713) 878-3598
(713) 878-3500

CWE
124 Sibley Avenue
Ardmore, PA 19003
(610) 642-7719 FAX: (610) 642-1532
http://www.cwe-inc.com

Cybex Computer Products
4991 Corporate Drive
Huntsville, AL 35805
(800) 932-9239 FAX: (800) 462-9239
http://www.cybex.com

Cygnus Technology
P.O. Box 219
Delaware Water Gap, PA 18327
(570) 424-5701 FAX: (570) 424-5630
http://www.cygnustech.com

Cymbus Biotechnology
Eagle Class, Chandler's Ford
Hampshire SO53 4NF, UK
(44) 1-703-267-676
FAX: (44) 1-703-267-677
http://www.biotech@cymbus.com

Cytogen
600 College Road East
Princeton, NJ 08540
(609) 987-8200 FAX: (609) 987-6450
http://www.cytogen.com

Cytogen Research and Development
89 Bellevue Hill Road
Boston, MA 02132
(617) 325-7774 FAX: (617) 327-2405

CytRx
154 Technology Parkway
Norcross, GA 30092
(800) 345-2987 FAX: (770) 368-0622
(770) 368-9500
http://www.cytrx.com

Dade Behring
Corporate Headquarters
1717 Deerfield Road
Deerfield, IL 60015
(847) 267-5300 FAX: (847) 267-1066
http://www.dadebehring.com

Dagan
2855 Park Avenue
Minneapolis, MN 55407
(612) 827-5959 FAX: (612) 827-6535
http://www.dagan.com

Dako
6392 Via Real
Carpinteria, CA 93013
(800) 235-5763 FAX: (805) 566-6688
(805) 566-6655
http://www.dakousa.com

Dako A/S
42 Produktionsvej
P.O. Box 1359
DK-2600 Glostrup, Denmark
(45) 4492-0044 FAX: (45) 4284-1822

Dakopatts
See Dako A/S

Dalton Chemical Laboratoris
349 Wildcat Road
Toronto, Ontario
M3J 253 Canada
(416) 661-2102 FAX: (416) 661-2108
(800) 567-5060 (in Canada only)
http://www.dalton.com

Damon, IEC
See Thermoquest

Dan Kar Scientific
150 West Street
Wilmington, MA 01887
(800) 942-5542 FAX: (978) 658-0380
(978) 988-9696
http://www.dan-kar.com

DataCell
Falcon Business Park
40 Ivanhoe Road
Finchampstead, Berkshire
RG40 4QQ, UK
(44) 1189 324324
FAX: (44) 1189 324325
http://www.datacell.co.uk
In the US:
(408) 446-3575 FAX: (408) 446-3589
http://www.datacell.com

DataWave Technologies
380 Main Street, Suite 209
Longmont, CO 80501
(800) 736-9283 FAX: (303) 776-8531
(303) 776-8214

Datex-Ohmeda
3030 Ohmeda Drive
Madison, WI 53718
(800) 345-2700 FAX: (608) 222-9147
(608) 221-1551
http://www.us.datex-ohmeda.com

DATU
82 State Street
Geneva, NY 14456
(315) 787-2240 FAX: (315) 787-2397
http://www.nysaes.cornell.edu/datu

David Kopf Instruments
7324 Elmo Street
P.O. Box 636
Tujunga, CA 91043
(818) 352-3274 FAX: (818) 352-3139

Decagon Devices
P.O. Box 835
950 NE Nelson Court
Pullman, WA 99163
(800) 755-2751 FAX: (509) 332-5158
(509) 332-2756
http://www.decagon.com

Decon Labs
890 Country Line Road
Bryn Mawr, PA 19010
(800) 332-6647 FAX: (610) 964-0650
(610) 520-0610
http://www.deconlabs.com

Decon Laboratories
Conway Street
Hove, Sussex BN3 3LY, UK
(44) 1273 739241
FAX: (44) 1273 722088

Degussa
Precious Metals Division
3900 South Clinton Avenue
South Plainfield, NJ 07080
(800) DEGUSSA FAX: (908) 756-7176
(908) 561-1100
http://www.degussa-huls.com

Deneba Software
1150 NW 72nd Avenue
Miami, FL 33126
(305) 596-5644 FAX: (305) 273-9069
http://www.deneba.com

Deseret Medical
524 West 3615 South
Salt Lake City, UT 84115
(801) 270-8440 FAX: (801) 293-9000

Devcon Plexus
30 Endicott Street
Danvers, MA 01923
(800) 626-7226 FAX: (978) 774-0516
(978) 777-1100
http://www.devcon.com

Developmental Studies Hybridoma Bank
University of Iowa
436 Biology Building
Iowa City, IA 52242
(319) 335-3826 FAX: (319) 335-2077
http://www.uiowa.edu/~dshbwww

DeVilbiss
Division of Sunrise Medical Respiratory
100 DeVilbiss Drive
P.O. Box 635
Somerset, PA 15501
(800) 338-1988 FAX: (814) 443-7572
(814) 443-4881
http://www.sunrisemedical.com

Dharmacon Research
1376 Miners Drive #101
Lafayette, CO 80026
(303) 604-9499 FAX: (303) 604-9680
http://www.dharmacom.com

DiaCheM
Triangle Biomedical
Gardiners Place
West Gillibrands, Lancashire
WN8 9SP, UK
(44) 1695-555581
FAX: (44) 1695-555518
http://www.diachem.co.uk

Diagen
Max-Volmer Strasse 4
D-40724 Hilden, Germany
(49) 2103-892-230
FAX: (49) 2103-892-222

Diagnostic Concepts
6104 Madison Court
Morton Grove, IL 60053
(847) 604-0957

Diagnostic Developments
See DiaCheM

Diagnostic Instruments
6540 Burroughs
Sterling Heights, MI 48314
(810) 731-6000 FAX: (810) 731-6469
http://www.diaginc.com

Diamedix
2140 North Miami Avenue
Miami, FL 33127
(800) 327-4565 FAX: (305) 324-2395
(305) 324-2300

DiaSorin
1990 Industrial Boulevard
Stillwater, MN 55082
(800) 328-1482 FAX: (651) 779-7847
(651) 439-9719
http://www.diasorin.com

Diatome US
321 Morris Road
Fort Washington, PA 19034
(800) 523-5874 FAX: (215) 646-8931
(215) 646-1478
http://www.emsdiasum.com

Difco Laboratories
See Becton Dickinson

Digene
1201 Clopper Road
Gaithersburg, MD 20878
(301) 944-7000 (800) 344-3631
FAX: (301) 944-7121
http://www.digene.com

Digi-Key
701 Brooks Avenue South
Thief River Falls, MN 56701
(800) 344-4539 FAX: (218) 681-3380
(218) 681-6674
http://www.digi-key.com

Digitimer
37 Hydeway
Welwyn Garden City, Hertfordshire
AL7 3BE, UK
(44) 1707-328347
FAX: (44) 1707-373153
http://www.digitimer.com

Dimco-Gray
8200 South Suburban Road
Dayton, OH 45458
(800) 876-8353 FAX: (937) 433-0520
(937) 433-7600
http://www.dimco-gray.com

Dionex
1228 Titan Way
P.O. Box 3603
Sunnyvale, CA 94088
(408) 737-0700 FAX: (408) 730-9403
http://dionex2.promptu.com

Display Systems Biotech
1260 Liberty Way, Suite B
Vista, CA 92083
(800) 697-1111 FAX: (760) 599-9930
(760) 599-0598
http://www.displaysystems.com

Diversified Biotech
1208 VFW Parkway
Boston, MA 02132
(617) 965-8557 FAX: (617) 323-5641
(800) 796-9199
http://www.divbio.com

DNA ProScan
P.O. Box 121585
Nashville, TN 37212
(800) 841-4362 FAX: (615) 292-1436
(615) 298-3524
http://www.dnapro.com

DNAStar
1228 South Park Street
Madison, WI 53715
(608) 258-7420 FAX: (608) 258-7439
http://www.dnastar.com

DNAVIEW
Attn: Charles Brenner
http://www.wco.com
~cbrenner/dnaview.htm

Doall NYC
36-06 48th Avenue
Long Island City, NY 11101
(718) 392-4595 FAX: (718) 392-6115
http://www.doall.com

Dojindo Molecular Technologies
211 Perry Street Parkway, Suite 5
Gaitherbusburg, MD 20877
(877) 987-2667
http://www.dojindo.com

Dolla Eastern
See Doall NYC

Dolan Jenner Industries
678 Andover Street
Lawrence, MA 08143
(978) 681-8000 (978) 682-2500
http://www.dolan-jenner.com

Dow Chemical
Customer Service Center
2040 Willard H. Dow Center
Midland, MI 48674
(800) 232-2436 FAX: (517) 832-1190
(409) 238-9321
http://www.dow.com

Dow Corning
Northern Europe
Meriden Business Park
Copse Drive
Allesley, Coventry CV5 9RG, UK
(44) 1676 528 000
FAX: (44) 1676 528 001

Dow Corning
P.O. Box 994
Midland, MI 48686
(517) 496-4000
http://www.dowcorning.com

Dow Corning (Lubricants)
2200 West Salzburg Road
Auburn, MI 48611
(800) 248-2481 FAX: (517) 496-6974
(517) 496-6000

Dremel
4915 21st Street
Racine, WI 53406
(414) 554-1390
http://www.dremel.com

Drummond Scientific
500 Parkway
P.O. Box 700
Broomall, PA 19008
(800) 523-7480 FAX: (610) 353-6204
(610) 353-0200
http://www.drummondsci.com

Duchefa Biochemie BV
P.O. Box 2281
2002 CG Haarlem, The Netherlands
31-0-23-5319093
FAX: 31-0-23-5318027
http://www.duchefa.com

Duke Scientific
2463 Faber Place
Palo Alto, CA 94303
(800) 334-3883 FAX: (650) 424-1158
(650) 424-1177
http://www.dukescientific.com

Duke University Marine Laboratory
135 Duke Marine Lab Road
Beaufort, NC 28516-9721
(252) 504-7503 FAX: (252) 504-7648
http://www.env.duke.edu/marinelab

DuPont Biotechnology Systems
See NEN Life Science Products

DuPont Medical Products
See NEN Life Science Products

DuPont Merck Pharmaceuticals
331 Treble Cove Road
Billerica, MA 01862
(800) 225-1572 FAX: (508) 436-7501
http://www.dupontmerck.com

DuPont NEN Products
See NEN Life Science Products

Dynal
5 Delaware Drive
Lake Success, NY 11042
(800) 638-9416 FAX: (516) 326-3298
(516) 326-3270
http://www.dynal.net

Dynal AS
Ullernchausen 52,
0379 Oslo, Norway
47-22-06-10-00 FAX: 47-22-50-70-15
http://www.dynal.no

Dynalab
P.O. Box 112
Rochester, NY 14692
(800) 828-6595 FAX: (716) 334-9496
(716) 334-2060
http://www.dynalab.com

Dynarex
1 International Boulevard
Brewster, NY 10509
(888) DYNAREX FAX: (914) 279-9601
(914) 279-9600
http://www.dynarex.com

Dynatech
See Dynex Technologies

Dynex Technologies
14340 Sullyfield Circle
Chantilly, VA 22021
(800) 336-4543 FAX: (703) 631-7816
(703) 631-7800
http://www.dynextechnologies.com

Dyno Mill
See Willy A. Bachofen

E.S.A.
22 Alpha Road
Chelmsford, MA 01824
(508) 250-7000 FAX: (508) 250-7090

E.W. Wright
760 Durham Road
Guilford, CT 06437
(203) 453-6410 FAX: (203) 458-6901
http://www.ewwright.com

E-Y Laboratories
107 N. Amphlett Boulevard
San Mateo, CA 94401
(800) 821-0044 FAX: (650) 342-2648
(650) 342-3296
http://www.eylabs.com

Eastman Kodak
1001 Lee Road
Rochester, NY 14650
(800) 225-5352 FAX: (800) 879-4979
(716) 722-5780 FAX: (716) 477-8040
http://www.kodak.com

ECACC
See European Collection of Animal Cell Cultures

EC Apparatus
See Savant/EC Apparatus

Ecogen, SRL
Gensura Laboratories
Ptge. Dos de Maig
9(08041) Barcelona, Spain
(34) 3-450-2601 FAX: (34) 3-456-0607
http://www.ecogen.com

Ecolab
370 North Wabasha Street
St. Paul, MN 55102
(800) 35-CLEAN FAX: (651) 225-3098
(651) 352-5326
http://www.ecolab.com

ECO PHYSICS
3915 Research Park Drive, Suite A-3
Ann Arbor, MI 48108
(734) 998-1600 FAX: (734) 998-1180
http://www.ecophysics.com

Edge Biosystems
19208 Orbit Drive
Gaithersburg, MD 20879-4149
(800) 326-2685 FAX: (301) 990-0881
(301) 990-2685
http://www.edgebio.com

Edmund Scientific
101 E. Gloucester Pike
Barrington, NJ 08007
(800) 728-6999 FAX: (856) 573-6263
(856) 573-6250
http://www.edsci.com

EG&G
See Perkin-Elmer

Ekagen
969 C Industry Road
San Carlos, CA 94070
(650) 592-4500 FAX: (650) 592-4500

Elcatech
P.O. Box 10935
Winston-Salem, NC 27108
(336) 544-8613 FAX: (336) 777-3623
(910) 777-3624
http://www.elcatech.com

Electron Microscopy Sciences
321 Morris Road
Fort Washington, PA 19034
(800) 523-5874 FAX: (215) 646-8931
(215) 646-1566
http://www.emsdiasum.com

Electron Tubes
100 Forge Way, Unit F
Rockaway, NJ 07866
(800) 521-8382 FAX: (973) 586-9771
(973) 586-9594
http://www.electrontubes.com

Elicay Laboratory Products, (UK) Ltd.
4 Manborough Mews
Crockford Lane
Basingstoke, Hampshire
RG 248NA, England
(256) 811-118 FAX: (256) 811-116
http://www.elkay-uk.co.uk

Eli Lilly
Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285
(800) 545-5979 FAX: (317) 276-2095
(317) 276-2000
http://www.lilly.com

ELISA Technologies
See Neogen

Elkins-Sinn
See Wyeth-Ayerst

EMBI
See European Bioinformatics Institute

EM Science
480 Democrat Road
Gibbstown, NJ 08027
(800) 222-0342 FAX: (856) 423-4389
(856) 423-6300
http://www.emscience.com

EM Separations Technology
See R & S Technology

Endogen
30 Commerce Way
Woburn, MA 01801
(800) 487-4885 FAX: (617) 439-0355
(781) 937-0890
http://www.endogen.com

ENGEL-Loter
HSGM Heatcutting Equipment
& Machines
1865 E. Main Street, No. 5
Duncan, SC 29334
(888) 854-HSGM FAX: (864) 486-8383
(864) 486-8300
http://www.engelgmbh.com

Enzo Diagnostics
60 Executive Boulevard
Farmingdale, NY 11735
(800) 221-7705 FAX: (516) 694-7501
(516) 694-7070
http://www.enzo.com

Enzogenetics
4197 NW Douglas Avenue
Corvallis, OR 97330
(541) 757-0288

The Enzyme Center
See Charm Sciences

Enzyme Systems Products
486 Lindbergh Avenue
Livermore, CA 94550
(888) 449-2664 FAX: (925) 449-1866
(925) 449-2664
http://www.enzymesys.com

Epicentre Technologies
1402 Emil Street
Madison, WI 53713
(800) 284-8474 FAX: (608) 258-3088
(608) 258-3080
http://www.epicentre.com

Erie Scientific
20 Post Road
Portsmouth, NH 03801
(888) ERIE-SCI FAX: (603) 431-8996
(603) 431-8410
http://www.eriesci.com

ES Industries
701 South Route 73
West Berlin, NJ 08091
(800) 356-6140 FAX: (856) 753-8484
(856) 753-8400
http://www.esind.com

ESA
22 Alpha Road
Chelmsford, MA 01824
(800) 959-5095 FAX: (978) 250-7090
(978) 250-7000
http://www.esainc.com

Ethicon
Route 22, P.O. Box 151
Somerville, NJ 08876
(908) 218-0707
http://www.ethiconinc.com

Ethicon Endo-Surgery
4545 Creek Road
Cincinnati, OH 45242
(800) 766-9534 FAX: (513) 786-7080

Eurogentec
Parc Scientifique du Sart Tilman
4102 Seraing, Belgium
32-4-240-76-76 FAX: 32-4-264-07-88
http://www.eurogentec.com

European Bioinformatics Institute
Wellcome Trust Genomes Campus
Hinxton, Cambridge CB10 1SD, UK
(44) 1223-49444
FAX: (44) 1223-494468

European Collection of Animal
Cell Cultures (ECACC)
Centre for Applied Microbiology &
Research
Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, UK
(44) 1980-612 512
FAX: (44) 1980-611 315
http://www.camr.org.uk

Evergreen Scientific
2254 E. 49th Street
P.O. Box 58248
Los Angeles, CA 90058
(800) 421-6261 FAX: (323) 581-2503
(323) 583-1331
http://www.evergreensci.com

Exalpha Biologicals
20 Hampden Street
Boston, MA 02205
(800) 395-1137 FAX: (617) 969-3872
(617) 558-3625
http://www.exalpha.com

Exciton
P.O. Box 31126
Dayton, OH 45437
(937) 252-2989 FAX: (937) 258-3937
http://www.exciton.com

Extrasynthese
ZI Lyon Nord
SA-BP62
69730 Genay, France
(33) 78-98-20-34
FAX: (33) 78-98-19-45

Factor II
1972 Forest Avenue
P.O. Box 1339
Lakeside, AZ 85929
(800) 332-8688 FAX: (520) 537-8066
(520) 537-8387
http://www.factor2.com

Falcon
See Becton Dickinson Labware

Febit AG
Käfertaler Strasse 190
D-68167 Mannheim
Germany
(49) 621-3804-0
FAX: (49) 621-3804-400
http://www.febit.com

Fenwal
See Baxter Healthcare

Filemaker
5201 Patrick Henry Drive
Santa Clara, CA 95054
(408) 987-7000 (800) 325-2747

Fine Science Tools
202-277 Mountain Highway
North Vancouver, British Columbia
V7J 3P2 Canada
(800) 665-5355 FAX: (800) 665 4544
(604) 980-2481 FAX: (604) 987-3299

Fine Science Tools
373-G Vintage Park Drive
Foster City, CA 94404
(800) 521-2109 FAX: (800) 523-2109
(650) 349-1636 FAX: (630) 349-3729

Fine Science Tools
Fahrtgasse 7-13
D-69117 Heidelberg, Germany
(49) 6221 905050
FAX: (49) 6221 600001
http://www.finescience.com

Finn Aqua
AMSCO Finn Aqua Oy
Teollisuustiez, FIN-04300
Tuusula, Finland
358 025851 FAX: 358 0276019

Finnigan
355 River Oaks Parkway
San Jose, CA 95134
(408) 433-4800 FAX: (408) 433-4821
http://www.finnigan.com

Dr. L. Fischer
Lutherstrasse 25A
D-69120 Heidelberg
Germany
(49) 6221-16-0368
http://home.eplus-online.de/
electroporation

Fisher Chemical Company
Fisher Scientific Limited
112 Colonnade Road
Nepean, Ontario K2E 7L6 Canada
(800) 234-7437 FAX: (800) 463-2996
http://www.fisherscientific.com

Fisher Scientific
2000 Park Lane
Pittsburgh, PA 15275
(800) 766-7000 FAX: (800) 926-1166
(412) 562-8300
http://www3.fishersci.com

W.F. Fisher & Son
220 Evans Way, Suite #1
Somerville, NJ 08876
(908) 707-4050 FAX: (908) 707-4099

Fitzco
5600 Pioneer Creek Drive
Maple Plain, MN 55359
(800) 367-8760 FAX: (612) 479-2880
(612) 479-3489
http://www.fitzco.com

5 Prime → 3 Prime
See 2000 Eppendorf-5 Prime
http://www.5prime.com

Flambeau
15981 Valplast Road
Middlefield, Ohio 44062
(800) 232-3474 FAX: (440) 632-1581
(440) 632-1631
http://www.flambeau.com

Fleisch (Rusch)
2450 Meadowbrook Parkway
Duluth, GA 30096
(770) 623-0816 FAX: (770) 623-1829
http://ruschinc.com

Flow Cytometry Standards
P.O. Box 194344
San Juan, PR 00919
(800) 227-8143 FAX: (787) 758-3267
(787) 753-9341
http://www.fcstd.com

Flow Labs
See ICN Biomedicals

Flow-Tech Supply
P.O. Box 1388
Orange, TX 77631
(409) 882-0306 FAX: (409) 882-0254
http://www.flow-tech.com

Fluid Marketing
See Fluid Metering

Fluid Metering
5 Aerial Way, Suite 500
Sayosett, NY 11791
(516) 922-6050 FAX: (516) 624-8261
http://www.fmipump.com

Fluorochrome
1801 Williams, Suite 300
Denver, CO 80264
(303) 394-1000 FAX: (303) 321-1119

Fluka Chemical
See Sigma-Aldrich

FMC BioPolymer
1735 Market Street
Philadelphia, PA 19103
(215) 299-6000 FAX: (215) 299-5809
http://www.fmc.com

FMC BioProducts
191 Thomaston Street
Rockland, ME 04841
(800) 521-0390 FAX: (800) 362-1133
(207) 594-3400 FAX: (207) 594-3426
http://www.bioproducts.com

Forma Scientific
Milcreek Road
P.O. Box 649
Marietta, OH 45750
(800) 848-3080 FAX: (740) 372-6770
(740) 373-4765
http://www.forma.com

Fort Dodge Animal Health
800 5th Street NW
Fort Dodge, IA 50501
(800) 685-5656 FAX: (515) 955-9193
(515) 955-4600
http://www.ahp.com

Fotodyne
950 Walnut Ridge Drive
Hartland, WI 53029
(800) 362-3686 FAX: (800) 362-3642
(262) 369-7000 FAX: (262) 369-7013
http://www.fotodyne.com

Fresenius HemoCare
6675 185th Avenue NE, Suite 100
Redwood, WA 98052
(800) 909-3872
(425) 497-1197
http://www.freseniusht.com

Fresenius Hemotechnology
See Fresenius HemoCare

Fuji Medical Systems
419 West Avenue
P.O. Box 120035
Stamford, CT 06902
(800) 431-1850 FAX: (203) 353-0926
(203) 324-2000
http://www.fujimed.com

Fujisawa USA
Parkway Center North
Deerfield, IL 60015-2548
(847) 317-1088 FAX: (847) 317-7298

Ernest F. Fullam
900 Albany Shaker Road
Latham, NY 12110
(800) 833-4024 FAX: (518) 785-8647
(518) 785-5533
http://www.fullam.com

Gallard-Schlesinger Industries
777 Zechendorf Boulevard
Garden City, NY 11530
(516) 229-4000 FAX: (516) 229-4015
http://www.gallard-schlessinger.com

Gambro
Box 7373
SE 103 91 Stockholm, Sweden
(46) 8 613 65 00
FAX: (46) 8 611 37 31
In the US: **COBE Laboratories**
225 Union Boulevard
Lakewood, CO 80215
(303) 232-6800 FAX: (303) 231-4915
http://www.gambro.com

Garner Glass
177 Indian Hill Boulevard
Claremont, CA 91711
(909) 624-5071 FAX: (909) 625-0173
http://www.garnerglass.com

Garon Plastics
16 Byre Avenue
Somerton Park, South Australia 5044
(08) 8294-5126 FAX: (08) 8376-1487
http://www.apache.airnet.com.au/~garon

Garren Scientific
9400 Lurline Avenue, Unit E
Chatsworth, CA 91311
(800) 342-3725 FAX: (818) 882-3229
(818) 882-6544
http://www.garren-scientific.com

GATC Biotech AG
Jakob-Stadler-Platz 7
D-78467 Constance, Germany
(49) 07531-8160-0
FAX: (49) 07531-8160-81
http://www.gatc-biotech.com

Gaussian
Carnegie Office Park
Building 6, Suite 230
Carnegie, PA 15106
(412) 279-6700 FAX: (412) 279-2118
http://www.gaussian.com

G.C. Electronics/A.R.C. Electronics
431 Second Street
Henderson, KY 42420
(270) 827-8981 FAX: (270) 827-8256
http://www.arcelectronics.com

GDB (Genome Data Base, Curation)
2024 East Monument Street, Suite 1200
Baltimore, MD 21205
(410) 955-9705 FAX: (410) 614-0434
http://www.gdb.org

GDB (Genome Data Base, Home)
Hospital for Sick Children
555 University Avenue
Toronto, Ontario
M5G 1X8 Canada
(416) 813-8744 FAX: (416) 813-8755
http://www.gdb.org

Gelman Sciences
See Pall-Gelman

Gemini BioProducts
5115-M Douglas Fir Road
Calabasas, CA 90403
(818) 591-3530 FAX: (818) 591-7084

Gen Trak
5100 Campus Drive
Plymouth Meeting, PA 19462
(800) 221-7407 FAX: (215) 941-9498
(215) 825-5115
http://www.informagen.com

Genaissance Pharmaceuticals
5 Science Park
New Haven, CT 06511
(800) 678-9487 FAX: (203) 562-9377
(203) 773-1450
http://www.genaissance.com

GENAXIS Biotechnology
Parc Technologique
10 Avenue Ampère
Montigny le Bretoneux
78180 France
(33) 01-30-14-00-20
FAX: (33) 01-30-14-00-15
http://www.genaxis.com

GenBank
National Center for Biotechnology Information
National Library of Medicine/NIH
Building 38A, Room 8N805
8600 Rockville Pike
Bethesda, MD 20894
(301) 496-2475 FAX: (301) 480-9241
http://www.ncbi.nlm.nih.gov

Gene Codes
640 Avis Drive
Ann Arbor, MI 48108
(800) 497-4939 FAX: (734) 930-0145
(734) 769-7249
http://www.genecodes.com

Genemachines
935 Washington Street
San Carlos, CA 94070
(650) 508-1634 FAX: (650) 508-1644
(877) 855-4363
http://www.genemachines.com

Genentech
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
(800) 551-2231 FAX: (650) 225-1600
(650) 225-1000
http://www.gene.com

General Scanning/GSI Luminomics
500 Arsenal Street
Watertown, MA 02172
(617) 924-1010 FAX: (617) 924-7327
http://www.genescan.com

General Valve
Division of Parker Hannifin Pneutronics
19 Gloria Lane
Fairfield, NJ 07004
(800) GVC-VALV
FAX: (800) GVC-1-FAX
http://www.pneutronics.com

Genespan
19310 North Creek Parkway, Suite 100
Bothell, WA 98011
(800) 231-2215 FAX: (425) 482-3005
(425) 482-3003
http://www.genespan.com

Gene Therapy Systems
10190 Telesis Court
San Diego, CA 92122
(858) 457-1919 FAX: (858) 623-9494
http://www.genetherapysystems.com

Généthon Human Genome
Research Center
1 bis rue de l'Internationale
91000 Evry, France
(33) 169-472828
FAX: (33) 607-78698
http://www.genethon.fr

Genetic Microsystems
34 Commerce Way
Woburn, MA 01801
(781) 932-9333 FAX: (781) 932-9433
http://www.genticmicro.com

Genetic Mutant Repository
See Coriell Institute for Medical Research

Genetic Research Instrumentation
Gene House
Queenborough Lane
Rayne, Braintree, Essex CM7 8TF, UK
(44) 1376 332900
FAX: (44) 1376 344724
http://www.gri.co.uk

Genetics Computer Group
575 Science Drive
Madison, WI 53711
(608) 231-5200 FAX: (608) 231-5202
http://www.gcg.com

Genetics Institute/American Home Products
87 Cambridge Park Drive
Cambridge, MA 02140
(617) 876-1170 FAX: (617) 876-0388
http://www.genetics.com

Genetix
63-69 Somerford Road
Christchurch, Dorset BH23 3QA, UK
(44) (0) 1202 483900
FAX: (44)(0) 1202 480289
In the US: (877) 436 3849
US FAX: (888) 522 7499
http://www.genetix.co.uk

Gene Tools
One Summerton Way
Philomath, OR 97370
(541) 9292-7840 FAX: (541) 9292-7841
http://www.gene-tools.com

Geneva Bioinformatics (GeneBio) S.A.
25 Avenue de Champel
CH—1206 Geneva, Switzerland
(41) 22-702-9900
FAX: (41) 22-702-9999
http://www.genebio.com

GeneWorks
P.O. Box 11, Rundle Mall
Adelaide, South Australia 5000, Australia
1800 882 555 FAX: (08) 8234 2699
(08) 8234 2644
http://www.geneworks.com

Genome Systems (INCYTE)
4633 World Parkway Circle
St. Louis, MO 63134
(800) 430-0030 FAX: (314) 427-3324
(314) 427-3222
http://www.genomesystems.com

Genomic Solutions
4355 Varsity Drive, Suite E
Ann Arbor, MI 48108
(877) GENOMIC FAX: (734) 975-4808
(734) 975-4800
http://www.genomicsolutions.com

Genomyx
See Beckman Coulter

Genosys Biotechnologies
1442 Lake Front Circle, Suite 185
The Woodlands, TX 77380
(281) 363-3693 FAX: (281) 363-2212
http://www.genosys.com

Genotech
92 Weldon Parkway
St. Louis, MO 63043
(800) 628-7730 FAX: (314) 991-1504
(314) 991-6034

GENSET
876 Prospect Street, Suite 206
La Jolla, CA 92037
(800) 551-5291 FAX: (619) 551-2041
(619) 515-3061
http://www.genset.fr

Gensia Laboratories Ltd.
19 Hughes
Irvine, CA 92718
(714) 455-4700 FAX: (714) 855-8210

Genta
99 Hayden Avenue, Suite 200
Lexington, MA 02421
(781) 860-5150 FAX: (781) 860-5137
http://www.genta.com

GENTEST
6 Henshaw Street
Woburn, MA 01801
(800) 334-5229 FAX: (888) 242-2226
(781) 935-5115 FAX: (781) 932-6855
http://www.gentest.com

Gentra Systems
15200 25th Avenue N., Suite 104
Minneapolis, MN 55447
(800) 866-3039 FAX: (612) 476-5850
(612) 476-5858
http://www.gentra.com

Genzyme
1 Kendall Square
Cambridge, MA 02139
(617) 252-7500 FAX: (617) 252-7600
http://www.genzyme.com
See also R&D Systems

Genzyme Genetics
One Mountain Road
Framingham, MA 01701
(800) 255-7357 FAX: (508) 872-9080
(508) 872-8400
http://www.genzyme.com

George Tiemann & Co.
25 Plant Avenue
Hauppauge, NY 11788
(516) 273-0005 FAX: (516) 273-6199

GIBCO/BRL
A Division of Life Technologies
1 Kendall Square
Grand Island, NY 14072
(800) 874-4226 FAX: (800) 352-1968
(716) 774-6700
http://www.lifetech.com

Gilmont Instruments
A Division of Barnant Company
28N092 Commercial Avenue
Barrington, IL 60010
(800) 637-3739 FAX: (708) 381-7053
http://barnant.com

Gilson
3000 West Beltline Highway
P.O. Box 620027
Middletown, WI 53562
(800) 445-7661
(608) 836-1551
http://www.gilson.com

Glas-Col Apparatus
P.O. Box 2128
Terre Haute, IN 47802
(800) Glas-Col FAX: (812) 234-6975
(812) 235-6167
http://www.glascol.com

Glaxo Wellcome
Five Moore Drive
Research Triangle Park, NC 27709
(800) SGL-AXO5 FAX: (919) 248-2386
(919) 248-2100
http://www.glaxowellcome.com

Glen Mills
395 Allwood Road
Clifton, NJ 07012
(973) 777-0777 FAX: (973) 777-0070
http://www.glenmills.com

Glen Research
22825 Davis Drive
Sterling, VA 20166
(800) 327-4536 FAX: (800) 934-2490
(703) 437-6191 FAX: (703) 435-9774
http://www.glenresearch.com

Glo Germ
P.O. Box 189
Moab, UT 84532
(800) 842-6622 FAX: (435) 259-5930
http://www.glogerm.com

Glyco
11 Pimentel Court
Novato, CA 94949
(800) 722-2597 FAX: (415) 382-3511
(415) 884-6799
http://www.glyco.com

Gould Instrument Systems
8333 Rockside Road
Valley View, OH 44125
(216) 328-7000 FAX: (216) 328-7400
http://www.gould13.com

Gralab Instruments
See Dimco-Gray

GraphPad Software
5755 Oberlin Drive #110
San Diego, CA 92121
(800) 388-4723 FAX: (558) 457-8141
(558) 457-3909
http://www.graphpad.com

Graseby Anderson
See Andersen Instruments
http://www.graseby.com

Grass Instrument
A Division of Astro-Med
600 East Greenwich Avenue
W. Warwick, RI 02893
(800) 225-5167 FAX: (877) 472-7749
http://www.grassinstruments.com

Greenacre and Misac Instruments
Misac Systems
27 Port Wood Road
Ware, Hertfordshire SF12 9NJ, UK
(44) 1920 463017
FAX: (44) 1920 465136

Greer Labs
639 Nuway Circle
Lenois, NC 28645
(704) 754-5237
http://greerlabs.com

Greiner
Maybachestrasse 2
Postfach 1162
D-7443 Frickenhausen, Germany
(49) 0 91 31/80 79 0
FAX: (49) 0 91 31/80 79 30
http://www.erlangen.com/greiner

GSI Lumonics
130 Lombard Street
Oxnard, CA 93030
(805) 485-5559 FAX: (805) 485-3310
http://www.gsilumonics.com

GTE Internetworking
150 Cambridge Park Drive
Cambridge, MA 02140
(800) 472-4565 FAX: (508) 694-4861
http://www.bbn.com

GW Instruments
35 Medford Street
Somerville, MA 02143
(617) 625-4096 FAX: (617) 625-1322
http://www.gwinst.com

H & H Woodworking
1002 Garfield Street
Denver, CO 80206
(303) 394-3764

Hacker Instruments
17 Sherwood Lane
P.O. Box 10033
Fairfield , NJ 07004
800-442-2537 FAX: (973) 808-8281
(973) 226-8450
http://www.hackerinstruments.com

Haemenetics
400 Wood Road
Braintree, MA 02184
(800) 225-5297 FAX: (781) 848-7921
(781) 848-7100
http://www.haemenetics.com

Halocarbon Products
P.O. Box 661
River Edge, NJ 07661
(201) 242-8899 FAX: (201) 262-0019
http://halocarbon.com

Hamamatsu Photonic Systems
A Division of Hamamatsu
360 Foothill Road
P.O. Box 6910
Bridgewater, NJ 08807
(908) 231-1116 FAX: (908) 231-0852
http://www.photonicsonline.com

Hamilton Company
4970 Energy Way
P.O. Box 10030
Reno, NV 89520
(800) 648-5950 FAX: (775) 856-7259
(775) 858-3000
http://www.hamiltoncompany.com

Hamilton Thorne Biosciences
100 Cummings Center, Suite 102C
Beverly, MA 01915
http://www.hamiltonthorne.com

Hampton Research
27631 El Lazo Road
Laguna Niguel, CA 92677
(800) 452-3899 FAX: (949) 425-1611
(949) 425-6321
http://www.hamptonresearch.com

Harlan Bioproducts for Science
P.O. Box 29176
Indianapolis, IN 46229
(317) 894-7521 FAX: (317) 894-1840
http://www.hbps.com

Harlan Sera-Lab
Hillcrest, Dodgeford Lane
Belton, Loughborough
Leicester LE12 9TE, UK
(44) 1530 222123
FAX: (44) 1530 224970
http://www.harlan.com

Harlan Teklad
P.O. Box 44220
Madison, WI 53744
(608) 277-2070 FAX: (608) 277-2066
http://www.harlan.com

Harrick Scientific Corporation
88 Broadway
Ossining, NY 10562
(914) 762-0020 FAX: (914) 762-0914
http://www.harricksci.com

Harrison Research
840 Moana Court
Palo Alto, CA 94306
(650) 949-1565 FAX: (650) 948-0493

Harvard Apparatus
84 October Hill Road
Holliston, MA 01746
(800) 272-2775 FAX: (508) 429-5732
(508) 893-8999
http://harvardapparatus.com

Harvard Bioscience
See Harvard Apparatus

Haselton Biologics
See JRH Biosciences

Hazelton Research Products
See Covance Research Products

Health Products
See Pierce Chemical

Heat Systems-Ultrasonics
1938 New Highway
Farmingdale, NY 11735
(800) 645-9846 FAX: (516) 694-9412
(516) 694-9555

Heidenhain Corp
333 East State Parkway
Schaumberg, IL 60173
(847) 490-1191 FAX: (847) 490-3931
http://www.heidenhain.com

HEKA Instruments
33 Valley Rd.
Southboro, MA 01960
(866) 742-0606 FAX: (508) 481-8945
www.heka.com

Hellma Cells
11831 Queens Boulevard
Forest Hills, NY 11375
(718) 544-9166 FAX: (718) 263-6910
http://www.helmaUSA.com

Hellma
Postfach 1163
D-79371 Müllheim/Baden, Germany
(49) 7631-1820
FAX: (49) 7631-13546
http://www.hellma-worldwide.de

Henry Schein
135 Duryea Road, Mail Room 150
Melville, NY 11747
(800) 472-4346 FAX: (516) 843-5652
http://www.henryschein.com

Heraeus Kulzer
4315 South Lafayette Boulevard
South Bend, IN 46614
(800) 343-5336
(219) 291-0661
http://www.kulzer.com

Heraeus Sepatech
See Kendro Laboratory Products

Hercules Aqualon
Aqualon Division
Hercules Research Center, Bldg. 8145
500 Hercules Road
Wilmington, DE 19899
(800) 345-0447 FAX: (302) 995-4787
http://www.herc.com/aqualon/pharma

Heto-Holten A/S
Gydevang 17-19
DK-3450 Allerod, Denmark
(45) 48-16-62-00
FAX: (45) 48-16-62-97
Distributed by ATR

Hettich-Zentrifugen
See Andreas Hettich

Hewlett-Packard
3000 Hanover Street
Mailstop 20B3
Palo Alto, CA 94304
(650) 857-1501 FAX: (650) 857-5518
http://www.hp.com

HGS Hinimoto Plastics
1-10-24 Meguro-Honcho
Megurouko
Tokyo 152, Japan
3-3714-7226 FAX: 3-3714-4657

Hitachi Scientific Instruments
Nissei Sangyo America
8100 N. First Street
San Elsa, CA 95314
(800) 548-9001 FAX: (408) 432-0704
(408) 432-0520
http://www.hii.hitachi.com

Hi-Tech Scientific
Brunel Road
Salisbury, Wiltshire, SP2 7PU
UK
(44) 1722-432320
(800) 344-0724 (US only)
http://www.hi-techsci.co.uk

Hoechst AG
See Aventis Pharmaceutical

Hoefer Scientific Instruments
Division of Amersham-Pharmacia Biotech
800 Centennial Avenue
Piscataway, NJ 08855
(800) 227-4750 FAX: (877) 295-8102
http://www.apbiotech.com

Hoffman-LaRoche
340 Kingsland Street
Nutley, NJ 07110
(800) 526-0189 FAX: (973) 235-9605
(973) 235-5000
http://www.rocheUSA.com

Holborn Surgical and Medical
Instruments
Westwood Industrial Estate
Ramsgate Road
Margate, Kent CT9 4JZ UK
(44) 1843 296666
FAX: (44) 1843 295446

Honeywell
101 Columbia Road
Morristown, NJ 07962
(973) 455-2000 FAX: (973) 455-4807
http://www.honeywell.com

Honeywell Specialty Films
P.O. Box 1039
101 Columbia Road
Morristown, NJ 07962
(800) 934-5679 FAX: (973) 455-6045
http://www.honeywell-specialtyfilms.com

Hood Thermo-Pad Canada
Comp. 20, Site 61A, RR2
Summerland, British Columbia
V0H 1Z0 Canada
(800) 665-9555 FAX: (250) 494-5003
(250) 494-5002
http://www.thermopad.com

Horiba Instruments
17671 Armstrong Avenue
Irvine, CA 92714
(949) 250-4811 FAX: (949) 250-0924
http://www.horiba.com

Hoskins Manufacturing
10776 Hall Road
P.O. Box 218
Hamburg, MI 48139
(810) 231-1900 FAX: (810) 231-4311
http://www.hoskinsmfgco.com

Hosokawa Micron Powder Systems
10 Chatham Road
Summit, NJ 07901
(800) 526-4491 FAX: (908) 273-7432
(908) 273-6360
http://www.hosokawamicron.com

HT Biotechnology
Unit 4
61 Ditton Walk
Cambridge CB5 8QD, UK
(44) 1223-412583

Hugo Sachs Electronik
Postfach 138
7806 March-Hugstetten, Germany
D-79229(49) 7665-92000
FAX: (49) 7665-920090

Human Biologics International
7150 East Camelback Road, Suite 245
Scottsdale, AZ 85251
(480) 990-2005 FAX: (480)-990-2155
http://www.humanbiological.com

Human Genetic Mutant Cell
Repository
See Coriell Institute for Medical Research

HVS Image
P.O. Box 100
Hampton, Middlesex TW12 2YD, UK
FAX: (44) 208 783 1223
In the US: (800) 225-9261
FAX: (888) 483-8033
http://www.hvsimage.com

Hybaid
111-113 Waldegrave Road
Teddington, Middlesex TW11 8LL, UK
(44) 0 1784 42500
FAX: (44) 0 1784 248085
http://www.hybaid.co.uk

Hybaid Instruments
8 East Forge Parkway
Franklin, MA 02028
(888)4-HYBAID FAX: (508) 541-3041
(508) 541-6918
http://www.hybaid.com

Hybridon
155 Fortune Boulevard
Milford, MA 01757
(508) 482-7500 FAX: (508) 482-7510
http://www.hybridon.com

HyClone Laboratories
1725 South HyClone Road
Logan, UT 84321
(800) HYCLONE FAX: (800) 533-9450
(801) 753-4584 FAX: (801) 750-0809
http://www.hyclone.com

Hyseq
670 Almanor Avenue
Sunnyvale, CA 94086
(408) 524-8100 FAX: (408) 524-8141
http://www.hyseq.com

IBA GmbH
1508 South Grand Blvd.
St. Louis, MO 63104
(877) 422-4624 FAX: (888) 531-6813
http://www.iba-go.com

IBF Biotechnics
See Sepracor

IBI (International Biotechnologies)
See Eastman Kodak
For technical service (800) 243-2555
(203) 786-5600

ICN Biochemicals
See ICN Biomedicals

ICN Biomedicals
3300 Hyland Avenue
Costa Mesa, CA 92626
(800) 854-0530 FAX: (800) 334-6999
(714) 545-0100 FAX: (714) 641-7275
http://www.icnbiomed.com

ICN Flow and Pharmaceuticals
See ICN Biomedicals

ICN Immunobiochemicals
See ICN Biomedicals

ICN Radiochemicals
See ICN Biomedicals

ICONIX
100 King Street West, Suite 3825
Toronto, Ontario
M5X 1E3 Canada
(416) 410-2411 FAX: (416) 368-3089
http://www.iconix.com

ICRT (Imperial Cancer Research Technology)
Sardinia House
Sardinia Street
London WC2A 3NL, UK
(44) 1712-421136
FAX: (44) 1718-314991

Idea Scientific Company
P.O. Box 13210
Minneapolis, MN 55414
(800) 433-2535 FAX: (612) 331-4217
http://www.ideascientific.com

IEC
See International Equipment Co.

IITC
23924 Victory Boulevard
Woodland Hills, CA 91367
(888) 414-4482 (818) 710-1556
FAX: (818) 992-5185
http://www.iitcinc.com

IKA Works
2635 N. Chase Parkway, SE
Wilmington, NC 28405
(910) 452-7059 FAX: (910) 452-7693
http://www.ika.net

Ikegami Electronics
37 Brook Avenue
Maywood, NJ 07607
(201) 368-9171 FAX: (201) 569-1626

Ikemoto Scientific Technology
25-11 Hongo
3-chome, Bunkyo-ku
Tokyo 101-0025, Japan
(81) 3-3811-4181
FAX: (81) 3-3811-1960

Imagenetics
See ATC Diagnostics

Imaging Research
c/o Brock University
500 Glenridge Avenue
St. Catharines, Ontario
L2S 3A1 Canada
(905) 688-2040 FAX: (905) 685-5861
http://www.imaging.brocku.ca

Imclone Systems
180 Varick Street
New York, NY 10014
(212) 645-1405 FAX: (212) 645-2054
http://www.imclone.com

IMCO Corporation LTD., AB
P.O. Box 21195
SE-100 31
Stockholm, Sweden
46-8-33-53-09 FAX: 46-8-728-47-76
http://www.imcocorp.se

Imgenex Corporation
11175 Flintkote Avenue
Suite E
San Diego, CA 92121
(888) 723-4363 FAX: (858) 642-0937
(858) 642.0978
http://www.imgenex.com

IMICO
Calle Vivero, No. 5-4a Planta
E-28040, Madrid, Spain
(34) 1-535-3960 FAX: (34) 1-535-2780

Immunex
51 University Street
Seattle, WA 98101
(206) 587-0430 FAX: (206) 587-0606
http://www.immunex.com

Immunochemistry Technologies
9401 James Avenue, South
Suite 155
Bloomington, MN 55431
(800) 829-3194 FAX: (952) 888-8988
(952) 888-8788
http://www.immunochemistry.com

Immunocorp
1582 W. Deere Avenue
Suite C
Irvine, CA 92606
(800) 446-3063
http://www.immunocorp.com

Immunotech
130, av. Delattre de Tassigny
B.P. 177
13276 Marseilles Cedex 9
France
(33) 491-17-27-00
FAX: (33) 491-41-43-58
http://www.immunotech.fr

Imperial Chemical Industries
Imperial Chemical House
Millbank, London SW1P 3JF, UK
(44) 171-834-4444
FAX: (44)171-834-2042
http://www.ici.com

Inceltech
See New Brunswick Scientific

Incstar
See DiaSorin

Incyte
6519 Dumbarton Circle
Fremont, CA 94555
(510) 739-2100 FAX: (510) 739-2200
http://www.incyte.com

Incyte Pharmaceuticals
3160 Porter Drive
Palo Alto, CA 94304
(877) 746-2983 FAX: (650) 855-0572
(650) 855-0555
http://www.incyte.com

Individual Monitoring Systems
6310 Harford Road
Baltimore, MD 21214

Indo Fine Chemical
P.O. Box 473
Somerville, NJ 08876
(888) 463-6346 FAX: (908) 359-1179
(908) 359-6778
http://www.indofinechemical.com

Industrial Acoustics
1160 Commerce Avenue
Bronx, NY 10462
(718) 931-8000 FAX: (718) 863-1138
http://www.industrialacoustics.com

Inex Pharmaceuticals
100-8900 Glenlyon Parkway
Glenlyon Business Park
Burnaby, British Columbia
V5J 5J8 Canada
(604) 419-3200 FAX: (604) 419-3201
http://www.inexpharm.com

Ingold, Mettler, Toledo
261 Ballardvale Street
Wilmington, MA 01887
(800) 352-8763 FAX: (978) 658-0020
(978) 658-7615
http://www.mt.com

Innogenetics N.V.
Technologie Park 6
B-9052 Zwijnaarde
Belgium
(32) 9-329-1329 FAX: (32) 9-245-7623
http://www.innogenetics.com

Innovative Medical Services
1725 Gillespie Way
El Cajon, CA 92020
(619) 596-8600 FAX: (619) 596-8700
http://www.imspure.com

Innovative Research
3025 Harbor Lane N, Suite 300
Plymouth, MN 55447
(612) 519-0105 FAX: (612) 519-0239
http://www.inres.com

Innovative Research of America
2 N. Tamiami Trail, Suite 404
Sarasota, FL 34236
(800) 421-8171 FAX: (800) 643-4345
(941) 365-1406 FAX: (941) 365-1703
http://www.innovrsrch.com

Inotech Biosystems
15713 Crabbs Branch Way, #110
Rockville, MD 20855
(800) 635-4070 FAX: (301) 670-2859
(301) 670-2850
http://www.inotechintl.com

INOVISION
22699 Old Canal Road
Yorba Linda, CA 92887
(714) 998-9600 FAX: (714) 998-9666
http://www.inovision.com

Instech Laboratories
5209 Militia Hill Road
Plymouth Meeting, PA 19462
(800) 443-4227 FAX: (610) 941-0134
(610) 941-0132
http://www.instechlabs.com

Instron
100 Royall Street
Canton, MA 02021
(800) 564-8378 FAX: (781) 575-5725
(781) 575-5000
http://www.instron.com

Instrumentarium
P.O. Box 300
00031 Instrumentarium
Helsinki, Finland
(10) 394-5566
http://www.instrumentarium.fi

Instruments SA
Division Jobin Yvon
16-18 Rue du Canal
91165 Longjumeau, Cedex, France
(33)1 6454-1300
FAX: (33)1 6909-9319
http://www.isainc.com

Instrutech
20 Vanderventer Avenue, Suite 101E
Port Washington, NY 11050
(516) 883-1300 FAX: (516) 883-1558
http://www.instrutech.com

Integrated DNA Technologies
1710 Commercial Park
Coralville, IA 52241
(800) 328-2661 FAX: (319) 626-8444
http://www.idtdna.com

Integrated Genetics
See Genzyme Genetics

Integrated Scientific Imaging Systems
3463 State Street, Suite 431
Santa Barbara, CA 93105
(805) 692-2390 FAX: (805) 692-2391
http://www.imagingsystems.com

Integrated Separation Systems (ISS)
See OWL Separation Systems

IntelliGenetics
See Oxford Molecular Group

Interactiva BioTechnologie
Sedanstrasse 10
D-89077 Ulm, Germany
(49) 731-93579-290
FAX: (49) 731-93579-291
http://www.interactiva.de

Interchim
213 J.F. Kennedy Avenue
B.P. 1140
Montlucon
03103 France
(33) 04-70-03-83-55
FAX: (33) 04-70-03-93-60

Interfocus
14/15 Spring Rise
Falcover Road
Haverhill, Suffolk CB9 7XU, UK
(44) 1440 703460
FAX: (44) 1440 704397
http://www.interfocus.ltd.uk

Intergen
2 Manhattanville Road
Purchase, NY 10577
(800) 431-4505 FAX: (800) 468-7436
(914) 694-1700 FAX: (914) 694-1429
http://www.intergenco.com

Intermountain Scientific
420 N. Keys Drive
Kaysville, UT 84037
(800) 999-2901 FAX: (800) 574-7892
(801) 547-5047 FAX: (801) 547-5051
http://www.bioexpress.com

International Biotechnologies (IBI)
See Eastman Kodak

International Equipment Co. (IEC)
See Thermoquest

International Institute for the
Advancement of Medicine
1232 Mid-Valley Drive
Jessup, PA 18434
(800) 486-IIAM FAX: (570) 343-6993
(570) 496-3400
http://www.iiam.org

International Light
17 Graf Road
Newburyport, MA 01950
(978) 465-5923 FAX: (978) 462-0759

International Market Supply (I.M.S.)
Dane Mill
Broadhurst Lane
Congleton, Cheshire CW12 1LA, UK
(44) 1260 275469
FAX: (44) 1260 276007

International Marketing Services
See International Marketing Ventures

International Marketing Ventures
6301 Ivy Lane, Suite 408
Greenbelt, MD 20770
(800) 373-0096 FAX: (301) 345-0631
(301) 345-2866
http://www.imvlimited.com

International Products
201 Connecticut Drive
Burlington, NJ 08016
(609) 386-8770 FAX: (609) 386-8438
http://www.mkt@ipcol.com

Intracel Corporation
Bartels Division
2005 Sammamish Road, Suite 107
Issaquah, WA 98027
(800) 542-2281 FAX: (425) 557-1894
(425) 392-2992
http://www.intracel.com

Invitrogen
1600 Faraday Avenue
Carlsbad, CA 92008
(800) 955-6288 FAX: (760) 603-7201
(760) 603-7200
http://www.invitrogen.com

In Vivo Metric
P.O. Box 249
Healdsburg, CA 95448
(707) 433-4819 FAX: (707) 433-2407

IRORI
9640 Towne Center Drive
San Diego, CA 92121
(858) 546-1300 FAX: (858) 546-3083
http://www.irori.com

Irvine Scientific
2511 Daimler Street
Santa Ana, CA 92705
(800) 577-6097 FAX: (949) 261-6522
(949) 261-7800
http://www.irvinesci.com

ISC BioExpress
420 North Kays Drive
Kaysville, UT 84037
(800) 999-2901 FAX: (800) 574-7892
(801) 547-5047
http://www.bioexpress.com

ISCO
P.O. Box 5347
4700 Superior
Lincoln, NE 68505
(800) 228-4373 FAX: (402) 464-0318
(402) 464-0231
http://www.isco.com

Isis Pharmaceuticals
Carlsbad Research Center
2292 Faraday Avenue
Carlsbad, CA 92008
(760) 931-9200
http://www.isip.com

Isolabs
See Wallac

ISS
See Integrated Separation Systems

J & W Scientific
See Agilent Technologies

J.A. Webster
86 Leominster Road
Sterling , MA 01564
(800) 225-7911 FAX: (978) 422-8959
http://www.jawebster.com

J.T. Baker
See Mallinckrodt Baker
222 Red School Lane
Phillipsburg, NJ 08865
(800) JTBAKER FAX: (908) 859-6974
http://www.jtbaker.com

Jackson ImmunoResearch
Laboratories
P.O. Box 9
872 W. Baltimore Pike
West Grove, PA 19390
(800) 367-5296 FAX: (610) 869-0171
(610) 869-4024
http://www.jacksonimmuno.com

The Jackson Laboratory
600 Maine Street
Bar Harbor, ME 04059
(800) 422-6423 FAX: (207) 288-5079
(207) 288-6000
http://www.jax.org

Jaece Industries
908 Niagara Falls Boulevard
North Tonawanda, NY 14120
(716) 694-2811 FAX: (716) 694-2811
http://www.jaece.com

Jandel Scientific
See SPSS

Janke & Kunkel
See Ika Works

Janssen Life Sciences Products
See Amersham

Janssen Pharmaceutica
1125 Trenton-Harbourton Road
Titusville, NJ 09560
(609) 730-2577 FAX: (609) 730-2116
http://us.janssen.com

Jasco
8649 Commerce Drive
Easton, MD 21601
(800) 333-5272 FAX: (410) 822-7526
(410) 822-1220
http://www.jascoinc.com

Jena Bioscience
Loebstedter Str. 78
07749 Jena, Germany
(49) 3641-464920
FAX: (49) 3641-464991
http://www.jenabioscience.com

Jencons Scientific
800 Bursca Drive, Suite 801
Bridgeville, PA 15017
(800) 846-9959 FAX: (412) 257-8809
(412) 257-8861
http://www.jencons.co.uk

JEOL Instruments
11 Dearborn Road
Peabody, MA 01960
(978) 535-5900 FAX: (978) 536-2205
http://www.jeol.com/index.html

Jewett
750 Grant Street
Buffalo, NY 14213
(800) 879-7767 FAX: (716) 881-6092
(716) 881-0030
http://www.JewettInc.com

John's Scientific
See VWR Scientific

John Weiss and Sons
95 Alston Drive
Bradwell Abbey
Milton Keynes, Buckinghamshire
MK1 4HF UK
(44) 1908-318017
FAX: (44) 1908-318708

Johnson & Johnson Medical
2500 Arbrook Boulevard East
Arlington, TX 76004
(800) 423-4018
http://www.jnjmedical.com

Johnston Matthey Chemicals
Orchard Road
Royston, Hertfordshire SG8 5HE, UK
(44) 1763-253000
FAX: (44) 1763-253466
http://www.chemicals.matthey.com

Jolley Consulting and Research
683 E. Center Street, Unit H
Grayslake, IL 60030
(847) 548-2330 FAX: (847) 548-2984
http://www.jolley.com

Jordan Scientific
See Shelton Scientific

Jorgensen Laboratories
1450 N. Van Buren Avenue
Loveland, CO 80538
(800) 525-5614 FAX: (970) 663-5042
(970) 669-2500
http://www.jorvet.com

JRH Biosciences and
JR Scientific
13804 W. 107th Street
Lenexa, KS 66215
(800) 231-3735 FAX: (913) 469-5584
(913) 469-5580

Jule Bio Technologies
25 Science Park, #14, Suite 695
New Haven, CT 06511
(800) 648-1772 FAX: (203) 786-5489
(203) 786-5490
http://hometown.aol.com/precastgel/index.htm

K.R. Anderson
2800 Bowers Avenue
Santa Clara, CA 95051
(800) 538-8712 FAX: (408) 727-2959
(408) 727-2800
http://www.kranderson.com

Kabi Pharmacia Diagnostics
See Pharmacia Diagnostics

Kanthal H.P. Reid
1 Commerce Boulevard
P.O. Box 352440
Palm Coast, FL 32135
(904) 445-2000 FAX: (904) 446-2244
http://www.kanthal.com

Kapak
5305 Parkdale Drive
St. Louis Park, MN 55416
(800) KAPAK-57 FAX: (612) 541-0735
(612) 541-0730
http://www.kapak.com

Karl Hecht
Stettener Str. 22-24
D-97647 Sondheim
Rhön, Germany
(49) 9779-8080 FAX: (49) 9779-80888

Karl Storz
Königin-Elisabeth Str. 60
D-14059 Berlin, Germany
(49) 30-30 69 09-0
FAX: (49) 30-30 19 452
http://www.karlstorz.de

KaVo EWL
P.O. Box 1320
D-88293 Leutkirch im Allgäu, Germany
(49) 7561-86-0 FAX: (49) 7561-86-371
http://www.kavo.com/english/startseite.htm

Keithley Instruments
28775 Aurora Road
Cleveland, OH 44139
(800) 552-1115 FAX: (440) 248-6168
(440) 248-0400
http://www.keithley.com

Kemin
2100 Maury Street, Box 70
Des Moines, IA 50301
(515) 266-2111 FAX: (515) 266-8354
http://www.kemin.com

Kemo
3 Brook Court, Blakeney Road
Beckenham, Kent BR3 1HG, UK
(44) 0181 658 3838
FAX: (44) 0181 658 4084
http://www.kemo.com

Kendall
15 Hampshire Street
Mansfield, MA 02048
(800) 962-9888 FAX: (800) 724-1324
http://www.kendallhq.com

Kendro Laboratory Products
31 Pecks Lane
Newtown, CT 06470
(800) 522-SPIN FAX: (203) 270-2166
(203) 270-2080
http://www.kendro.com

Kendro Laboratory Products
P.O. Box 1220
Am Kalkberg
D-3360 Osterod, Germany
(55) 22-316-213
FAX: (55) 22-316-202
http://www.heraeus-instruments.de

Kent Laboratories
23404 NE 8th Street
Redmond, WA 98053
(425) 868-6200 FAX: (425) 868-6335
http://www.kentlabs.com

Kent Scientific
457 Bantam Road, #16
Litchfield, CT 06759
(888) 572-8887 FAX: (860) 567-4201
(860) 567-5496
http://www.kentscientific.com

Keuffel & Esser
See Azon

Keystone Scientific
Penn Eagle Industrial Park
320 Rolling Ridge Drive
Bellefonte, PA 16823
(800) 437-2999 FAX: (814) 353-2305
(814) 353-2300 Ext 1
http://www.keystonescientific.com

Kimble/Kontes Biotechnology
1022 Spruce Street
P.O. Box 729
Vineland, NJ 08360
(888) 546-2531 FAX: (856) 794-9762
(856) 692-3600
http://www.kimble-kontes.com

Kinematica AG
Luzernerstrasse 147a
CH-6014 Littau-Luzern, Switzerland
(41) 41 2501257 FAX: (41) 41 2501460
http://www.kinematica.ch

Kin-Tek
504 Laurel Street
LaMarque, TX 77568
(800) 326-3627
FAX: (409) 938-3710
http://www.kin-tek.com

Kipp & Zonen
125 Wilbur Place
Bohemia, NY 11716
(800) 645-2065 FAX: (516) 589-2068
(516) 589-2885
http://www.kippzonen.thomasregister.com/olc/kippzonen

Kirkegaard & Perry Laboratories
2 Cessna Court
Gaithersburg, MD 20879
(800) 638-3167 FAX: (301) 948-0169
(301) 948-7755
http://www.kpl.com

Kodak
See Eastman Kodak

Kontes Glass
See Kimble/Kontes Biotechnology

Kontron Instruments AG
Postfach CH-8010
Zurich, Switzerland
41-1-733-5733 FAX: 41-1-733-5734

David Kopf Instruments
P.O. Box 636
Tujunga, CA 91043
(818) 352-3274 FAX: (818) 352-3139

Kraft Apparatus
See Glas-Col Apparatus

Kramer Scientific Corporation
711 Executive Boulevard
Valley Cottage, NY 10989
(845) 267-5050 FAX: (845) 267-5550

Kulite Semiconductor Products
1 Willow Tree Road
Leonia, NJ 07605
(201) 461-0900 FAX: (201) 461-0990
http://www.kulite.com

Lab-Line Instruments
15th & Bloomingdale Avenues
Melrose Park, IL 60160
(800) LAB-LINE FAX: (708) 450-5830
FAX: (800) 450-4LAB
http://www.labline.com

Lab Products
742 Sussex Avenue
P.O. Box 639
Seaford, DE 19973
(800) 526-0469 FAX: (302) 628-4309
(302) 628-4300
http://www.labproductsinc.com

LabRepco
101 Witmer Road, Suite 700
Horsham, PA 19044
(800) 521-0754 FAX: (215) 442-9202
http://www.labrepco.com

Lab Safety Supply
P.O. Box 1368
Janesville, WI 53547
(800) 356-0783 FAX: (800) 543-9910
(608) 754-7160 FAX: (608) 754-1806
http://www.labsafety.com

Lab-Tek Products
See Nalge Nunc International

Labconco
8811 Prospect Avenue
Kansas City, MO 64132
(800) 821-5525 FAX: (816) 363-0130
(816) 333-8811
http://www.labconco.com

Labindustries
See Barnstead/Thermolyne

Labnet International
P.O. Box 841
Woodbridge, NJ 07095
(888) LAB-NET1 FAX: (732) 417-1750
(732) 417-0700
http://www.nationallabnet.com

LABO-MODERNE
37 rue Dombasle
Paris
75015 France
(33) 01-45-32-62-54
FAX: (33) 01-45-32-01-09
http://www.labomoderne.com/fr

Laboratory of Immunoregulation
National Institute of Allergy and Infectious Diseases/NIH
9000 Rockville Pike
Building 10, Room 11B13
Bethesda, MD 20892
(301) 496-1124

Laboratory Supplies
29 Jefry Lane
Hicksville, NY 11801
(516) 681-7711

Labscan Limited
Stillorgan Industrial Park
Stillorgan
Dublin, Ireland
(353) 1-295-2684
FAX: (353) 1-295-2685
http://www.labscan.ie

Labsystems
See Thermo Labsystems

Labsystems Affinity Sensors
Saxon Way, Bar Hill
Cambridge CB3 8SL, UK
44 (0) 1954 789976
FAX: 44 (0) 1954 789417
http://www.affinity-sensors.com

Labtronics
546 Governors Road
Guelph, Ontario
N1K 1E3 Canada
(519) 763-4930 FAX: (519) 836-4431
http://www.labtronics.com

Labtronix Manufacturing
3200 Investment Boulevard
Hayward, CA 94545
(510) 786-3200 FAX: (510) 786-3268
http://www.labtronix.com

Lafayette Instrument
3700 Sagamore Parkway North
P.O. Box 5729
Lafayette, IN 47903
(800) 428-7545 FAX: (765) 423-4111
(765) 423-1505
http://www.lafayetteinstrument.com

Lambert Instruments
Turfweg 4
9313 TH Leutingewolde
The Netherlands
(31) 50-5018461 FAX: (31) 50-5010034
http://www.lambert-instruments.com

Lampire Biological Laboratories
P.O. Box 270
Pipersville, PA 18947
(215) 795-2538 FAX: (215) 795-0237
http://www.lampire.com

Lancaster Synthesis
P.O. Box 1000
Windham, NH 03087
(800) 238-2324 FAX: (603) 889-3326
(603) 889-3306
http://www.lancastersynthesis-us.com

Lancer
140 State Road 419
Winter Springs, FL 32708
(800) 332-1855 FAX: (407) 327-1229
(407) 327-8488
http://www.lancer.com

LaVision GmbH
Gerhard-Gerdes-Str. 3
D-37079
Goettingen, Germany
(49) 551-50549-0
FAX: (49) 551-50549-11
http://www.lavision.de

Lawshe
See Advanced Process Supply

Laxotan
20, rue Leon Blum
26000 Valence, France
(33) 4-75-41-91-91
FAX: (33) 4-75-41-91-99
http://www.latoxan.com

LC Laboratories
165 New Boston Street
Woburn, MA 01801
(781) 937-0777 FAX: (781) 938-5420
http://www.lclaboratories.com

LC Packings
80 Carolina Street
San Francisco, CA 94103
(415) 552-1855 FAX: (415) 552-1859
http://www.lcpackings.com

LC Services
See LC Laboratories

LECO
3000 Lakeview Avenue
St. Joseph, MI 49085
(800) 292-6141 FAX: (616) 982-8977
(616) 985-5496
http://www.leco.com

Lederle Laboratories
See Wyeth-Ayerst

Lee Biomolecular Research
Laboratories
11211 Sorrento Valley Road, Suite M
San Diego, CA 92121
(858) 452-7700

The Lee Company
2 Pettipaug Road
P.O. Box 424
Westbrook, CT 06498
(800) LEE-PLUG FAX: (860) 399-7058
(860) 399-6281
http://www.theleeco.com

Lee Laboratories
1475 Athens Highway
Grayson, GA 30017
(800) 732-9150 FAX: (770) 979-9570
(770) 972-4450
http://www.leelabs.com

Leica
111 Deer Lake Road
Deerfield, IL 60015
(800) 248-0123 FAX: (847) 405-0147
(847) 405-0123
http://www.leica.com

Leica Microsystems
Imneuenheimer Feld 518
D-69120
Heidelberg, Germany
(49) 6221-41480
FAX: (49) 6221-414833
http://www.leica-microsystems.com

Leinco Technologies
359 Consort Drive
St. Louis, MO 63011
(314) 230-9477 FAX: (314) 527-5545
http://www.leinco.com

Leitz U.S.A.
See Leica

LenderKing Metal Products
8370 Jumpers Hole Road
Millersville, MD 21108
(410) 544-8795 FAX: (410) 544-5069
http://www.lenderking.com

Letica Scientific Instruments
Panlab s.i., c/Loreto 50
08029 Barcelona, Spain
(34) 93-419-0709
FAX: (34) 93-419-7145
http://www.panlab-sl.com

Leybold-Heraeus Trivac DZA
5700 Mellon Road
Export, PA 15632
(412) 327-5700

LI-COR
Biotechnology Division
4308 Progressive Avenue
Lincoln, NE 68504
(800) 645-4267 FAX: (402) 467-0819
(402) 467-0700
http://www.licor.com

Life Science Laboratories
See Adaptive Biosystems

Life Science Resources
Two Corporate Center Drive
Melville, NY 11747
(800) 747-9530 FAX: (516) 844-5114
(516) 844-5085
http://www.astrocam.com

Life Sciences
2900 72nd Street North
St. Petersburg, FL 33710
(800) 237-4323 FAX: (727) 347-2957
(727) 345-9371
http://www.lifesci.com

Life Technologies
9800 Medical Center Drive
P.O. Box 6482
Rockville, MD 20849
(800) 828-6686 FAX: (800) 331-2286
http://www.lifetech.com

Lifecodes
550 West Avenue
Stamford, CT 06902
(800) 543-3263 FAX: (203) 328-9599
(203) 328-9500
http://www.lifecodes.com

Lightnin
135 Mt. Read Boulevard
Rochester, NY 14611
(888) MIX-BEST FAX: (716) 527-1742
(716) 436-5550
http://www.lightnin-mixers.com

Linear Drives
Luckyn Lane, Pipps Hill
Basildon, Essex SS14 3BW, UK
(44) 1268-287070
FAX: (44) 1268-293344
http://www.lineardrives.com

Linscott's Directory
4877 Grange Road
Santa Rosa, CA 95404
(707) 544-9555 FAX: (415) 389-6025
http://www.linscottsdirectory.co.uk

Linton Instrumentation
Unit 11, Forge Business Center
Upper Rose Lane
Palgrave, Diss, Norfolk IP22 1AP, UK
(44) 1-379-651-344
FAX: (44) 1-379-650-970
http://www.lintoninst.co.uk

List Biological Laboratories
501-B Vandell Way
Campbell, CA 95008
(800) 726-3213 FAX: (408) 866-6364
(408) 866-6363
http://www.listlabs.com

LKB Instruments
See Amersham Pharmacia Biotech

Lloyd Laboratories
604 West Thomas Avenue
Shenandoah, IA 51601
(800) 831-0004 FAX: (712) 246-5245
(712) 246-4000
http://www.lloydinc.com

Loctite
1001 Trout Brook Crossing
Rocky Hill, CT 06067
(860) 571-5100 FAX: (860)571-5465
http://www.loctite.com

Lofstrand Labs
7961 Cessna Avenue
Gaithersburg, MD 20879
(800) 541-0362 FAX: (301) 948-9214
(301) 330-0111
http://www.lofstrand.com

Lomir Biochemical
99 East Main Street
Malone, NY 12953
(877) 425-3604 FAX: (518) 483-8195
(518) 483-7697
http://www.lomir.com

LSL Biolafitte
10 rue de Temara
7810C St.-Germain-en-Laye, France
(33) 1-3061-5260
FAX: (33) 1-3061-5234

Ludl Electronic Products
171 Brady Avenue
Hawthorne, NY 10532
(888) 769-6111 FAX: (914) 769-4759
(914) 769-6111
http://www.ludl.com

Lumigen
24485 W. Ten Mile Road
Southfield, MI 48034
(248) 351-5600 FAX: (248) 351-0518
http://www.lumigen.com

Luminex
12212 Technology Boulevard
Austin, TX 78727
(888) 219-8020 FAX: (512) 258-4173
(512) 219-8020
http://www.luminexcorp.com

LYNX Therapeutics
25861 Industrial Boulevard
Hayward, CA 94545
(510) 670-9300 FAX: (510) 670-9302
http://www.lynxgen.com

Lyphomed
3 Parkway North
Deerfield, IL 60015
(847) 317-8100 FAX: (847) 317-8600

M.E.D. Associates
See Med Associates

Macherey-Nagel
6 South Third Street, #402
Easton, PA 18042
(610) 559-9848 FAX: (610) 559-9878
http://www.macherey-nagel.com

Macherey-Nagel
Valencienner Strasse 11
P.O. Box 101352
D-52313 Dueren, Germany
(49) 2421-969141
FAX: (49) 2421-969199
http://www.macherey-nagel.ch

Mac-Mod Analytical
127 Commons Court
Chadds Ford, PA 19317
800-441-7508 FAX: (610) 358-5993
(610) 358-9696
http://www.mac-mod.com

Mallinckrodt Baker
222 Red School Lane
Phillipsburg, NJ 08865
(800) 582-2537 FAX: (908) 859-6974
(908) 859-2151
http://www.mallbaker.com

Mallinckrodt Chemicals
16305 Swingley Ridge Drive
Chesterfield, MD 63017
(314) 530-2172 FAX: (314) 530-2563
http://www.mallchem.com

Malven Instruments
Enigma Business Park
Grovewood Road
Malven, Worchestershire
WR 141 XZ, United Kingdom

Marinus
1500 Pier C Street
Long Beach, CA 90813
(562) 435-6522 FAX: (562) 495-3120

Markson Science
c/o Whatman Labs Sales
P.O. Box 1359
Hillsboro, OR 97123
(800) 942-8626 FAX: (503) 640-9716
(503) 648-0762

Marsh Biomedical Products
565 Blossom Road
Rochester, NY 14610
(800) 445-2812 FAX: (716) 654-4810
(716) 654-4800
http://www.biomar.com

Marshall Farms USA
5800 Lake Bluff Road
North Rose, NY 14516
(315) 587-2295
e-mail: info@marfarms.com

Martek
6480 Dobbin Road
Columbia, MD 21045
(410) 740-0081 FAX: (410) 740-2985
http://www.martekbio.com

Martin Supply
Distributor of Gerber Scientific
2740 Loch Raven Road
Baltimore, MD 21218
(800) 282-5440 FAX: (410) 366-0134
(410) 366-1696

Mast Immunosystems
630 Clyde Court
Mountain View, CA 94043
(800) 233-MAST FAX: (650) 969-2745
(650) 961-5501
http://www.mastallergy.com

Matheson Gas Products
P.O. Box 624
959 Route 46 East
Parsippany, NJ 07054
(800) 416-2505 FAX: (973) 257-9393
(973) 257-1100
http://www.mathesongas.com

Mathsoft
1700 Westlake Avenue N., Suite 500
Seattle, WA 98109
(800) 569-0123 FAX: (206) 283-8691
(206) 283-8802
http://www.mathsoft.com

Matreya
500 Tressler Street
Pleasant Gap, PA 16823
(814) 359-5060 FAX: (814) 359-5062
http://www.matreya.com

Matrigel
See Becton Dickinson Labware

Matrix Technologies
22 Friars Drive
Hudson, NH 03051
(800) 345-0206 FAX: (603) 595-0106
(603) 595-0505
http://www.matrixtechcorp.com

MatTek Corp.
200 Homer Avenue
Ashland, Massachusetts 01721
(508) 881-6771 FAX: (508) 879-1532
http://www.mattek.com

Maxim Medical
89 Oxford Road
Oxford OX2 9PD
United Kingdom
44 (0)1865-865943
FAX: 44 (0)1865-865291
http://www.maximmed.com

Mayo Clinic
Section on Engineering
Project #ALA-1, 1982
200 1st Street SW
Rochester, MN 55905
(507) 284-2511 FAX: (507) 284-5988

McGaw
See B. Braun-McGaw

McMaster-Carr
600 County Line Road
Elmhurst, IL 60126
(630) 833-0300 FAX: (630) 834-9427
http://www.mcmaster.com

McNeil Pharmaceutical
See Ortho McNeil Pharmaceutical

MCNC
3021 Cornwallis Road
P.O. Box 12889
Research Triangle Park, NC 27709
(919) 248-1800 FAX: (919) 248-1455
http://www.mcnc.org

MD Industries
5 Revere Drive, Suite 415
Northbrook, IL 60062
(800) 421-8370 FAX: (847) 498-2627
(708) 339-6000
http://www.mdindustries.com

MDS Nordion
447 March Road
P.O. Box 13500
Kanata, Ontario
K2K 1X8 Canada
(800) 465-3666 FAX: (613) 592-6937
(613) 592-2790
http://www.mds.nordion.com

MDS Sciex
71 Four Valley Drive
Concord, Ontario
Canada L4K 4V8
(905) 660-9005 FAX: (905) 660-2600
http://www.sciex.com

Mead Johnson
See Bristol-Meyers Squibb

Med Associates
P.O. Box 319
St. Albans, VT 05478
(802) 527-2343 FAX: (802) 527-5095
http://www.med-associates.com

Medecell
239 Liverpool Road
London N1 1LX, UK
(44) 20-7607-2295
FAX: (44) 20-7700-4156
http://www.medicell.co.uk

Media Cybernetics
8484 Georgia Avenue, Suite 200
Silver Spring, MD 20910
(301) 495-3305 FAX: (301) 495-5964
http://www.mediacy.com

Mediatech
13884 Park Center Road
Herndon, VA 20171
(800) cellgro
(703) 471-5955
http://www.cellgro.com

Medical Systems
See Harvard Apparatus

Medifor
647 Washington Street
Port Townsend, WA 98368
(800) 366-3710 FAX: (360) 385-4402
(360) 385-0722
http://www.medifor.com

MedImmune
35 W. Watkins Mill Road
Gaithersburg, MD 20878
(301) 417-0770 FAX: (301) 527-4207
http://www.medimmune.com

MedProbe AS
P.O. Box 2640
St. Hanshaugen
N-0131 Oslo, Norway
(47) 222 00137 FAX: (47) 222 00189
http://www.medprobe.com

Megazyme
Bray Business Park
Bray, County Wicklow
Ireland
(353) 1-286-1220
FAX: (353) 1-286-1264
http://www.megazyme.com

Melles Griot
4601 Nautilus Court South
Boulder, CO 80301
(800) 326-4363 FAX: (303) 581-0960
(303) 581-0337
http://www.mellesgriot.com

Menzel-Glaser
Postfach 3157
D-38021 Braunschweig, Germany
(49) 531 590080
FAX: (49) 531 509799

E. Merck
Frankfurterstrasse 250
D-64293 Darmstadt 1, Germany
(49) 6151-720

Merck
See EM Science

Merck & Company
Merck National Service Center
P.O. Box 4
West Point, PA 19486
(800) NSC-MERCK
(215) 652-5000
http://www.merck.com

Merck Research Laboratories
See Merck & Company

Merck Sharpe Human Health Division
300 Franklin Square Drive
Somerset, NJ 08873
(800) 637-2579 FAX: (732) 805-3960
(732) 805-0300

Merial Limited
115 Transtech Drive
Athens, GA 30601
(800) MERIAL-1 FAX: (706) 548-0608
(706) 548-9292
http://www.merial.com

Meridian Instruments
P.O. Box 1204
Kent, WA 98035
(253) 854-9914 FAX: (253) 854-9902
http://www.minstrument.com

Meta Systems Group
32 Hammond Road
Belmont, MA 02178
(617) 489-9950 FAX: (617) 489-9952

Metachem Technologies
3547 Voyager Street, Bldg. 102
Torrance, CA 90503
(310) 793-2300 FAX: (310) 793-2304
http://www.metachem.com

Metallhantering
Box 47172
100-74 Stockholm, Sweden
(46) 8-726-9696

MethylGene
7220 Frederick-Banting, Suite 200
Montreal, Quebec
H4S 2A1 Canada
http://www.methylgene.com

Metro Scientific
475 Main Street, Suite 2A
Farmingdale, NY 11735
(800) 788-6247 FAX: (516) 293-8549
(516) 293-9656

Metrowerks
980 Metric Boulevard
Austin, TX 78758
(800) 377-5416
(512) 997-4700
http://www.metrowerks.com

Mettler Instruments
Mettler-Toledo
1900 Polaris Parkway
Columbus, OH 43240
(800) METTLER FAX: (614) 438-4900
http://www.mt.com

Miami Serpentarium Labs
34879 Washington Loop Road
Punta Gorda, FL 33982
(800) 248-5050 FAX: (813) 639-1811
(813) 639-8888
http://www.miamiserpentarium.com

Michrom BioResources
1945 Industrial Drive
Auburn, CA 95603
(530) 888-6498 FAX: (530) 888-8295
http://www.michrom.com

Mickle Laboratory Engineering
Gomshall, Surrey, UK
(44) 1483-202178

Micra Scientific
A division of Eichrom Industries
8205 S. Cass Ave, Suite 111
Darien, IL 60561
(800) 283-4752 FAX: (630) 963-1928
(630) 963-0320
http://www.micrasci.com

MicroBrightField
74 Hegman Avenue
Colchester, VT 05446
(802) 655-9360 FAX: (802) 655-5245
http://www.microbrightfield.com

Micro Essential Laboratory
4224 Avenue H
Brooklyn, NY 11210
(718) 338-3618 FAX: (718) 692-4491

Micro Filtration Systems
7-3-Chome, Honcho
Nihonbashi, Tokyo, Japan
(81) 3-270-3141

Micro-Metrics
P.O. Box 13804
Atlanta, GA 30324
(770) 986-6015 FAX: (770) 986-9510
http://www.micro-metrics.com

Micro-Tech Scientific
140 South Wolfe Road
Sunnyvale, CA 94086
(408) 730-8324 FAX: (408) 730-3566
http://www.microlc.com

Microbix Biosystems
341 Bering Avenue
Toronto, Ontario
M8Z 3A8 Canada
1-800-794-6694 FAX: 416-234-1626
1-416-234-1624
http://www.microbix.com

MicroCal
22 Industrial Drive East
Northampton, MA 01060
(800) 633-3115 FAX: (413) 586-0149
(413) 586-7720
http://www.microcalorimetry.com

Microfluidics
30 Ossipee Road
P.O. Box 9101
Newton, MA 02164
(800) 370-5452 FAX: (617) 965-1213
(617) 969-5452
http://www.microfluidicscorp.com

Microgon
See Spectrum Laboratories

Microlase Optical Systems
West of Scotland Science Park
Kelvin Campus, Maryhill Road
Glasgow G20 0SP, UK
(44) 141-948-1000
FAX: (44) 141-946-6311
http://www.microlase.co.uk

Micron Instruments
4509 Runway Street
Simi Valley, CA 93063
(800) 638-3770 FAX: (805) 522-4982
(805) 552-4676
http://www.microninstruments.com

Micron Separations
See MSI

Micro Photonics
4949 Liberty Lane, Suite 170
P.O. Box 3129
Allentown, PA 18106
(610) 366-7103 FAX: (610) 366-7105
http://www.microphotonics.com

MicroTech
1420 Conchester Highway
Boothwyn, PA 19061
(610) 459-3514

Midland Certified Reagent Company
3112-A West Cuthbert Avenue
Midland, TX 79701
(800) 247-8766 FAX: (800) 359-5789
(915) 694-7950 FAX: (915) 694-2387
http://www.mcrc.com

Midwest Scientific
280 Vance Road
Valley Park, MO 63088
(800) 227-9997 FAX: (636) 225-9998
(636) 225-9997
http://www.midsci.com

Miles
See Bayer

Miles Laboratories
See Serological

Miles Scientific
See Nunc

Millar Instruments
P.O. Box 230227
6001-A Gulf Freeway
Houston, TX 77023
(713) 923-9171 FAX: (713) 923-7757
http://www.millarinstruments.com

MilliGen/Biosearch
See Millipore

Millipore
80 Ashbury Road
P.O. Box 9125
Bedford, MA 01730
(800) 645-5476 FAX: (781) 533-3110
(781) 533-6000
http://www.millipore.com

Miltenyi Biotec
251 Auburn Ravine Road, Suite 208
Auburn, CA 95603
(800) 367-6227 FAX: (530) 888-8925
(530) 888-8871
http://www.miltenyibiotec.com

Miltex
6 Ohio Drive
Lake Success, NY 11042
(800) 645-8000 FAX: (516) 775-7185
(516) 349-0001

Milton Roy
See Spectronic Instruments

Mini-Instruments
15 Burnham Business Park
Springfield Road
Burnham-on-Crouch, Essex CM0 8TE, UK
(44) 1621-783282
FAX: (44) 1621-783132
http://www.mini-instruments.co.uk

Mini Mitter
P.O. Box 3386
Sunriver, OR 97707
(800) 685-2999 FAX: (541) 593-5604
(541) 593-8639
http://www.minimitter.com

Mirus Corporation
505 S. Rosa Road
Suite 104
Madison, WI 53719
(608) 441-2852 FAX: (608) 441-2849
http://www.genetransfer.com

Misonix
1938 New Highway
Farmingdale, NY 11735
(800) 645-9846 FAX: (516) 694-9412
http://www.misonix.com

Mitutoyo (MTI)
See Dolla Eastern

MJ Research
Waltham, MA 02451
(800) PELTIER FAX: (617) 923-8080
(617) 923-8000
http://www.mjr.com

Modular Instruments
228 West Gay Street
Westchester, PA 19380
(610) 738-1420 FAX: (610) 738-1421
http://www.mi2.com

Molecular Biology Insights
8685 US Highway 24
Cascade, CO 80809-1333
(800) 747-4362 FAX: (719) 684-7989
(719) 684-7988
http://www.oligo.net

Molecular Biosystems
10030 Barnes Canyon Road
San Diego, CA 92121
(858) 452-0681 FAX: (858) 452-6187
http://www.mobi.com

Molecular Devices
1312 Crossman Avenue
Sunnyvale, CA 94089
(800) 635-5577 FAX: (408) 747-3602
(408) 747-1700
http://www.moldev.com

Molecular Designs
1400 Catalina Street
San Leandro, CA 94577
(510) 895-1313 FAX: (510) 614-3608

Molecular Dynamics
928 East Arques Avenue
Sunnyvale, CA 94086
(800) 333-5703 FAX: (408) 773-1493
(408) 773-1222
http://www.apbiotech.com

Molecular Probes
4849 Pitchford Avenue
Eugene, OR 97402
(800) 438-2209 FAX: (800) 438-0228
(541) 465-8300 FAX: (541) 344-6504
http://www.probes.com

Molecular Research Center
5645 Montgomery Road
Cincinnati, OH 45212
(800) 462-9868 FAX: (513) 841-0080
(513) 841-0900
http://www.mrcgene.com

Molecular Simulations
9685 Scranton Road
San Diego, CA 92121
(800) 756-4674 FAX: (858) 458-0136
(858) 458-9990
http://www.msi.com

Monoject Disposable Syringes & Needles/Syrvet
16200 Walnut Street
Waukee, IA 50263
(800) 727-5203 FAX: (515) 987-5553
(515) 987-5554
http://www.syrvet.com

Monsanto Chemical
800 North Lindbergh Boulevard
St. Louis, MO 63167
(314) 694-1000 FAX: (314) 694-7625
http://www.monsanto.com

Moravek Biochemicals
577 Mercury Lane
Brea, CA 92821
(800) 447-0100 FAX: (714) 990-1824
(714) 990-2018
http://www.moravek.com

Moss
P.O. Box 189
Pasadena, MD 21122
(800) 932-6677 FAX: (410) 768-3971
(410) 768-3442
http://www.mosssubstrates.com

Motion Analysis
3617 Westwind Boulevard
Santa Rosa, CA 95403
(707) 579-6500 FAX: (707) 526-0629
http://www.motionanalysis.com

Mott
Farmington Industrial Park
84 Spring Lane
Farmington, CT 06032
(860) 747-6333 FAX: (860) 747-6739
http://www.mottcorp.com

MSI (Micron Separations)
See Osmonics

Multi Channel Systems
Markwiesenstrasse 55
72770 Reutlingen, Germany
(49) 7121-503010
FAX: (49) 7121-503011
http://www.multichannelsystems.com

Multiple Peptide Systems
3550 General Atomics Court
San Diego, CA 92121
(800) 338-4965 FAX: (800) 654-5592
(858) 455-3710 FAX: (858) 455-3713
http://www.mps-sd.com

Murex Diagnostics
3075 Northwoods Circle
Norcross, GA 30071
(707) 662-0660 FAX: (770) 447-4989

MWG-Biotech
Anzinger Str. 7
D-85560 Ebersberg, Germany
(49) 8092-82890 FAX: (49) 8092-21084
http://www.mwg_biotech.com

Myriad Industries
3454 E Street
San Diego, CA 92102
(800) 999-6777 FAX: (619) 232-4819
(619) 232-6700
http://www.myriadindustries.com

Nacalai Tesque
Nijo Karasuma, Nakagyo-ku
Kyoto 604, Japan
81-75-251-1723
FAX: 81-75-251-1762
http://www.nacalai.co.jp

Nalge Nunc International
Subsidiary of Sybron International
75 Panorama Creek Drive
P.O. Box 20365
Rochester, NY 14602
(800) 625-4327 FAX: (716) 586-8987
(716) 264-9346
http://www.nalgenunc.com

Nanogen
10398 Pacific Center Court
San Diego, CA 92121
(858) 410-4600 FAX: (858) 410-4848
http://www.nanogen.com

Nanoprobes
95 Horse Block Road
Yaphank, NY 11980
(877) 447-6266 FAX: (631) 205-9493
(631) 205-9490
http://www.nanoprobes.com

Narishige USA
1710 Hempstead Turnpike
East Meadow, NY 11554
(800) 445-7914 FAX: (516) 794-0066
(516) 794-8000
http://www.narishige.co.jp

Nasco-Fort Atkinson
P.O. Box 901
901 Janesville Ave.
Fort Atkinson, WI 53538-0901
(800) 558-9595 FAX: (920) 563-8296
http://www.enasco.com

National Bag Company
2233 Old Mill Road
Hudson, OH 44236
(800) 247-6000 FAX: (330) 425-9800
(330) 425-2600
http://www.nationalbag.com

National Band and Tag
Department X 35, Box 72430
Newport, KY 41032
(606) 261-2035 FAX: (800) 261-8247
https://www.nationalband.com

National Biosciences
See Molecular Biology Insights

National Diagnostics
305 Patton Drive
Atlanta, GA 30336
(800) 526-3867 FAX: (404) 699-2077
(404) 699-2121
http://www.nationaldiagnostics.com

National Disease Research Exchange
1880 John F. Kennedy Blvd., 11th Fl.
Philadelphia, PA 19103
(800) 222-6374
http://www.ndri.com

National Institute of Standards and Technology
100 Bureau Drive
Gaithersburg, MD 20899
(301) 975-NIST FAX: (301) 926-1630
http://www.nist.gov

National Instruments
11500 North Mopac Expressway
Austin, TX 78759
(512) 794-0100 FAX: (512) 683-8411
http://www.ni.com

National Labnet
See Labnet International

National Scientific Instruments
975 Progress Circle
Lawrenceville, GA 300243
(800) 332-3331 FAX: (404) 339-7173
http://www.nationalscientific.com

National Scientific Supply
1111 Francisco Bouldvard East
San Rafael, CA 94901
(800) 525-1779 FAX: (415) 459-2954
(415) 459-6070
http://www.nat-sci.com

Naz-Dar-KC Chicago
Nazdar
1087 N. North Branch Street
Chicago, IL 60622
(800) 736-7636 FAX: (312) 943-8215
(312) 943-8338
http://www.nazdar.com

NB Labs
1918 Avenue A
Denison, TX 75021
(903) 465-2694 FAX: (903) 463-5905
http://www.nblabslarry.com

NEB
See New England Biolabs

NEN Life Science Products
549 Albany Street
Boston, MA 02118
(800) 551-2121 FAX: (617) 451-8185
(617) 350-9075
http://www.nen.com

NEN Research Products, Dupont (UK)
Diagnostics and Biotechnology Systems
Wedgewood Way
Stevenage, Hertfordshire SG1 4QN, UK
44-1438-734831
44-1438-734000
FAX: 44-1438-734836
http://www.dupont.com

Neogen
628 Winchester Road
Lexington, KY 40505
(800) 477-8201 FAX: (606) 255-5532
(606) 254-1221
http://www.neogen.com

Neosystems
380, 11012 Macleod Trail South
Calgary, Alberta
T2J 6A5 Canada
(403) 225-9022 FAX: (403) 225-9025
http://www.neosystems.com

Neuralynx
2434 North Pantano Road
Tucson, AZ 85715
(520) 722-8144 FAX: (520) 722-8163
http://www.neuralynx.com

Neuro Probe
16008 Industrial Drive
Gaithersburg, MD 20877
(301) 417-0014 FAX: (301) 977-5711
http://www.neuroprobe.com

Neurocrine Biosciences
10555 Science Center Drive
San Diego, CA 92121
(619) 658-7600 FAX: (619) 658-7602
http://www.neurocrine.com

Nevtek
HCR03, Box 99
Burnsville, VA 24487
(540) 925-2322 FAX: (540) 925-2323
http://www.nevtek.com

New Brunswick Scientific
44 Talmadge Road
Edison, NJ 08818
(800) 631-5417 FAX: (732) 287-4222
(732) 287-1200
http://www.nbsc.com

New England Biolabs (NEB)
32 Tozer Road
Beverly, MA 01915
(800) 632-5227 FAX: (800) 632-7440
http://www.neb.com

New England Nuclear (NEN)
See NEN Life Science Products

New MBR
Gubelstrasse 48
CH8050 Zurich, Switzerland
(41) 1-313-0703

Newark Electronics
4801 N. Ravenswood Avenue
Chicago, IL 60640
(800) 4-NEWARK FAX: (773) 907-5339
(773) 784-5100
http://www.newark.com

Newell Rubbermaid
29 E. Stephenson Street
Freeport, IL 61032
(815) 235-4171 FAX: (815) 233-8060
http://www.newellco.com

Newport Biosystems
1860 Trainor Street
Red Bluff, CA 96080
(530) 529-2448 FAX: (530) 529-2648

Newport
1791 Deere Avenue
Irvine, CA 92606
(800) 222-6440 FAX: (949) 253-1800
(949) 253-1462
http://www.newport.com

Nexin Research B.V.
P.O. Box 16
4740 AA Hoeven, The Netherlands
(31) 165-503172
FAX: (31) 165-502291

NIAID
See Bio-Tech Research Laboratories

Nichiryo
230 Route 206
Building 2-2C
Flanders, NJ 07836
(877) 548-6667 FAX: (973) 927-0099
(973) 927-4001
http://www.nichiryo.com

Nichols Institute Diagnostics
33051 Calle Aviador
San Juan Capistrano, CA 92675
(800) 286-4NID FAX: (949) 240-5273
(949) 728-4610
http://www.nicholsdiag.com

Nichols Scientific Instruments
3334 Brown Station Road
Columbia, MO 65202
(573) 474-5522 FAX: (603) 215-7274
http://home.beseen.com
technology/nsi_technology

Nicolet Biomedical Instruments
5225 Verona Road, Building 2
Madison, WI 53711
(800) 356-0007 FAX: (608) 441-2002
(608) 273-5000
http://nicoletbiomedical.com

N.I.G.M.S. (National Institute of
General Medical Sciences)
See Coriell Institute for Medical Research

Nikon
Science and Technologies Group
1300 Walt Whitman Road
Melville, NY 11747
(516) 547-8500 FAX: (516) 547-4045
http://www.nikonusa.com

Nippon Gene
1-29, Ton-ya-machi
Toyama 930, Japan
(81) 764-51-6548
FAX: (81) 764-51-6547

Noldus Information Technology
751 Miller Drive
Suite E-5
Leesburg, VA 20175
(800) 355-9541 FAX: (703) 771-0441
(703) 771-0440
http://www.noldus.com

Nonlinear Dynamics
See NovoDynamics

Nordion International
See MDS Nordion

North American Biologicals (NABI)
16500 NW 15th Avenue
Miami, FL 33169
(800) 327-7106 (305) 625-5305
http://www.nabi.com

North American Reiss
See Reiss

Northwestern Bottle
24 Walpole Park South
Walpole, MA 02081
(508) 668-8600 FAX: (508) 668-7790

NOVA Biomedical
Nova Biomedical 200
Prospect Street Waltham, MA 02454
(800) 822-0911 FAX: (781) 894-5915
http://www.novabiomedical.com

Novagen
601 Science Drive
Madison, WI 53711
(800) 526-7319 FAX: (608) 238-1388
(608) 238-6110
http://www.novagen.com

Novartis
59 Route 10
East Hanover, NJ 07936
(800)526-0175 FAX: (973) 781-6356
http://www.novartis.com

Novartis Biotechnology
3054 Cornwallis Road
Research Triangle Park, NC 27709
(888) 462-7288 FAX: (919) 541-8585
http://www.novartis.com

Nova Sina AG
Subsidiary of Airflow Lufttechnik GmbH
Kleine Heeg 21
52259 Rheinbach, Germany
(49) 02226 920-0
FAX: (49) 02226 9205-11

Novex/Invitrogen
1600 Faraday
Carlsbad, CA 92008
(800) 955-6288 FAX: (760) 603-7201
http://www.novex.com

Novo Nordisk Biochem
77 Perry Chapel Church Road
Franklington, NC 27525
(800) 879-6686 FAX: (919) 494-3450
(919) 494-3000
http://www.novo.dk

Novo Nordisk BioLabs
See Novo Nordisk Biochem

Novocastra Labs
Balliol Business Park West
Benton Lane
Newcastle-upon-Tyne
Tyne and Wear NE12 8EW, UK
(44) 191-215-0567
FAX: (44) 191-215-1152
http://www.novocastra.co.uk

NovoDynamics
123 North Ashley Street
Suite 210
Ann Arbor, MI 48104
(734) 205-9100 FAX: (734) 205-9101
http://www.novodynamics.com

Novus Biologicals
P.O. Box 802
Littleton, CO 80160
(888) 506-6887 FAX: (303) 730-1966
http://www.novus-biologicals.com/main.html

NPI Electronic
Hauptstrasse 96
D-71732 Tamm, Germany
(49) 7141-601534
FAX: (49) 7141-601266
http://www.npielectronic.com

NSG Precision Cells
195G Central Avenue
Farmingdale, NY 11735
(516) 249-7474 FAX: (516) 249-8575
http://www.nsgpci.com

Nu Chek Prep
109 West Main
P.O. Box 295
Elysian, MN 56028
(800) 521-7728 FAX: (507) 267-4790
(507) 267-4689

Nuclepore
See Costar

Numonics
101 Commerce Drive
Montgomeryville, PA 18936
(800) 523-6716 FAX: (215) 361-0167
(215) 362-2766
http://www.interactivewhiteboards.com

NYCOMED AS Pharma
c/o Accurate Chemical & Scientific
300 Shames Drive
Westbury, NY 11590
(800) 645-6524 FAX: (516) 997-4948
(516) 333-2221
http://www.accuratechemical.com

Nycomed Amersham
Health Care Division
101 Carnegie Center
Princeton, NJ 08540
(800) 832-4633 FAX: (800) 807-2382
(609) 514-6000
http://www.nycomed-amersham.com

Nyegaard
Herserudsvagen 5254
S-122 06 Lidingo, Sweden
(46) 8-765-2930

Ohmeda Catheter Products
See Datex-Ohmeda

Ohwa Tsusbo
Hiby Dai Building
1-2-2 Uchi Saiwai-cho
Chiyoda-ku
Tokyo 100, Japan
03-3591-7348 FAX: 03-3501-9001

Oligos Etc.
9775 S.W. Commerce Circle, C-6
Wilsonville, OR 97070
(800) 888-2358 FAX: (503) 6822D1635
(503) 6822D1814
http://www.oligoetc.com

Olis Instruments
130 Conway Drive
Bogart, GA 30622
(706) 353-6547 (800) 852-3504
http://www.olisweb.com

Olympus America
2 Corporate Center Drive
Melville, NY 11747
(800) 645-8160 FAX: (516) 844-5959
(516) 844-5000
http://www.olympusamerica.com

Omega Engineering
One Omega Drive
P.O. Box 4047
Stamford, CT 06907
(800) 848-4286 FAX: (203) 359-7700
(203) 359-1660
http://www.omega.com

Omega Optical
3 Grove Street
P.O. Box 573
Brattleboro, VT 05302
(802) 254-2690 FAX: (802) 254-3937
http://www.omegafilters.com

Omnetics Connector Corporation
7260 Commerce Circle
East Minneapolis, MN 55432
(800) 343-0025 (763) 572-0656
Fax: (763) 572-3925
http://www.omnetics.com/main.htm

Omni International
6530 Commerce Court
Warrenton, VA 20187
(800) 776-4431 FAX: (540) 347-5352
(540) 347-5331
http://www.omni-inc.com

Omnion
2010 Energy Drive
P.O. Box 879
East Troy, WI 53120
(262) 642-7200 FAX: (262) 642-7760
http://www.omnion.com

Omnitech Electronics
See AccuScan Instruments

Oncogene Research Products
P.O. Box Box 12087
La Jolla, CA 92039-2087
(800) 662-2616 FAX: (800) 766-0999
http://www.apoptosis.com

Oncogene Science
See OSI Pharmaceuticals

Oncor
See Intergen

Online Instruments
130 Conway Drive, Suites A & B
Bogart, GA 30622
(800) 852-3504 (706) 353-1972
(706) 353-6547
http://www.olisweb.com

Operon Technologies
1000 Atlantic Avenue
Alameda, CA 94501
(800) 688-2248 FAX: (510) 865-5225
(510) 865-8644
http://www.operon.com

Optiscan
P.O. Box 1066
Mount Waverly MDC, Victoria
Australia 3149
61-3-9538 3333 FAX: 61-3-9562 7742
http://www.optiscan.com.au

Optomax
9 Ash Street
P.O. Box 840
Hollis, NH 03049
(603) 465-3385 FAX: (603) 465-2291

Opto-Line Associates
265 Ballardvale Street
Wilmington, MA 01887
(978) 658-7255 FAX: (978) 658-7299
http://www.optoline.com

Orbigen
6827 Nancy Ridge Drive
San Diego, CA 92121
(866) 672-4436 (858) 362-2030
(858) 362-2026
http://www.orbigen.com

Oread BioSaftey
1501 Wakarusa Drive
Lawrence, KS 66047
(800) 447-6501 FAX: (785) 749-1882
(785) 749-0034
http://www.oread.com

Organomation Associates
266 River Road West
Berlin, MA 01503
(888) 978-7300 FAX: (978)838-2786
(978) 838-7300
http://www.organomation.com

Organon
375 Mount Pleasant Avenue
West Orange, NJ 07052
(800) 241-8812 FAX: (973) 325-4589
(973) 325-4500
http://www.organon.com

Organon Teknika (Canada)
30 North Wind Place
Scarborough, Ontario
M1S 3R5 Canada
(416) 754-4344 FAX: (416) 754-4488
http://www.organonteknika.com

Organon Teknika Cappel
100 Akzo Avenue
Durham, NC 27712
(800) 682-2666 FAX: (800) 432-9682
(919) 620-2000 FAX: (919) 620-2107
http://www.organonteknika.com

Oriel Corporation of America
150 Long Beach Boulevard
Stratford, CT 06615
(203) 377-8282 FAX: (203) 378-2457
http://www.oriel.com

OriGene Technologies
6 Taft Court, Suite 300
Rockville, MD 20850
(888) 267-4436 FAX: (301) 340-9254
(301) 340-3188
http://www.origene.com

OriginLab
One Roundhouse Plaza
Northhampton, MA 01060
(800) 969-7720 FAX: (413) 585-0126
http://www.originlab.com

Orion Research
500 Cummings Center
Beverly, MA 01915
(800) 225-1480 FAX: (978) 232-6015
(978) 232-6000
http://www.orionres.com

Ortho Diagnostic Systems
Subsidiary of Johnson & Johnson
1001 U.S. Highway 202
P.O. Box 350
Raritan, NJ 08869
(800) 322-6374 FAX: (908) 218-8582
(908) 218-1300

Ortho McNeil Pharmaceutical
Welsh & McKean Road
Spring House, PA 19477
(800) 682-6532
(215) 628-5000
http://www.orthomcneil.com

Oryza
200 Turnpike Road, Unit 5
Chelmsford, MA 01824
(978) 256-8183 FAX: (978) 256-7434
http://www.oryzalabs.com

OSI Pharmaceuticals
106 Charles Lindbergh Boulevard
Uniondale, NY 11553
(800) 662-2616 FAX: (516) 222-0114
(516) 222-0023
http://www.osip.com

Osmonics
135 Flanders Road
P.O. Box 1046
Westborough, MA 01581
(800) 444-8212 FAX: (508) 366-5840
(508) 366-8212
http://www.osmolabstore.com

Oster Professional Products
150 Cadillac Lane
McMinnville, TN 37110
(931) 668-4121 FAX: (931) 668-4125
http://www.sunbeam.com

Out Patient Services
1260 Holm Road
Petaluma, CA 94954
(800) 648-1666 FAX: (707) 762-7198
(707) 763-1581

OWL Scientific Plastics
See OWL Separation Systems

OWL Separation Systems
55 Heritage Avenue
Portsmouth, NH 03801
(800) 242-5560 FAX: (603) 559-9258
(603) 559-9297
http://www.owlsci.com

Oxford Biochemical Research
P.O. Box 522
Oxford, MI 48371
(800) 692-4633 FAX: (248) 852-4466
http://www.oxfordbiomed.com

Oxford GlycoSystems
See Glyco

Oxford Instruments
Old Station Way
Eynsham
Witney, Oxfordshire OX8 1TL, UK
(44) 1865-881437
FAX: (44) 1865-881944
http://www.oxinst.com

Oxford Labware
See Kendall

Oxford Molecular Group
Oxford Science Park
The Medawar Centre
Oxford OX4 4GA, UK
(44) 1865-784600
FAX: (44) 1865-784601
http://www.oxmol.co.uk

Oxford Molecular Group
2105 South Bascom Avenue, Suite 200
Campbell, CA 95008
(800) 876-9994 FAX: (408) 879-6302
(408) 879-6300
http://www.oxmol.com

OXIS International
6040 North Cutter Circle
Suite 317
Portland, OR 97217
(800) 547-3686 FAX: (503) 283-4058
(503) 283-3911
http://www.oxis.com

Oxoid
800 Proctor Avenue
Ogdensburg, NY 13669
(800) 567-8378 FAX: (613) 226-3728
http://www.oxoid.ca

Oxoid
Wade Road
Basingstoke, Hampshire RG24 8PW, UK
(44) 1256-841144
FAX: (4) 1256-814626
http://www.oxoid.ca

Oxyrase
P.O. Box 1345
Mansfield, OH 44901
(419) 589-8800 FAX: (419) 589-9919
http://www.oxyrase.com

Ozyme
10 Avenue Ampère
Montigny de Bretoneux
78180 France
(33) 13-46-02-424
FAX: (33) 13-46-09-212
http://www.ozyme.fr

PAA Laboratories
2570 Route 724
P.O. Box 435
Parker Ford, PA 19457
(610) 495-9400 FAX: (610) 495-9410
http://www.paa-labs.com

Pacer Scientific
5649 Valley Oak Drive
Los Angeles, CA 90068
(323) 462-0636 FAX: (323) 462-1430
http://www.pacersci.com

Pacific Bio-Marine Labs
P.O. Box 1348
Venice, CA 90294
(310) 677-1056 FAX: (310) 677-1207

Packard Instrument
800 Research Parkway
Meriden, CT 06450
(800) 323-1891 FAX: (203) 639-2172
(203) 238-2351
http://www.packardinst.com

Padgett Instrument
1730 Walnut Street
Kansas City, MO 64108
(816) 842-1029

Pall Filtron
50 Bearfoot Road
Northborough, MA 01532
(800) FILTRON FAX: (508) 393-1874
(508) 393-1800

Pall-Gelman
25 Harbor Park Drive
Port Washington, NY 11050
(800) 289-6255 FAX: (516) 484-2651
(516) 484-3600
http://www.pall.com

PanVera
545 Science Drive
Madison, WI 53711
(800) 791-1400 FAX: (608) 233-3007
(608) 233-9450
http://www.panvera.com

Parke-Davis
See Warner-Lambert

Parr Instrument
211 53rd Street
Moline, IL 61265
(800) 872-7720 FAX: (309) 762-9453
(309) 762-7716
http://www.parrinst.com

Partec
Otto Hahn Strasse 32
D-48161 Munster, Germany
(49) 2534-8008-0
FAX: (49) 2535-8008-90

PCR
See Archimica Florida

PE Biosystems
850 Lincoln Centre Drive
Foster City, CA 94404
(800) 345-5224 FAX: (650) 638-5884
(650) 638-5800
http://www.pebio.com

Pel-Freez Biologicals
219 N. Arkansas
P.O. Box 68
Rogers, AR 72757
(800) 643-3426 FAX: (501) 636-3562
(501) 636-4361
http://www.pelfreez-bio.com

Pel-Freez Clinical Systems
Subsidiary of Pel-Freez Biologicals
9099 N. Deerbrook Trail
Brown Deer, WI 53223
(800) 558-4511 FAX: (414) 357-4518
(414) 357-4500
http://www.pelfreez-bio.com

Peninsula Laboratories
601 Taylor Way
San Carlos, CA 94070
(800) 650-4442 FAX: (650) 595-4071
(650) 592-5392
http://www.penlabs.com

Pentex
24562 Mando Drive
Laguna Niguel, CA 92677
(800) 382-4667 FAX: (714) 643-2363
http://www.pentex.com

PeproTech
5 Crescent Avenue
P.O. Box 275
Rocky Hill, NJ 08553
(800) 436-9910 FAX: (609) 497-0321
(609) 497-0253
http://www.peprotech.com

Peptide Institute
4-1-2 Ina, Minoh-shi
Osaka 562-8686, Japan
81-727-29-4121 FAX: 81-727-29-4124
http://www.peptide.co.jp

Peptide Laboratory
4175 Lakeside Drive
Richmond, CA 94806
(800) 858-7322 FAX: (510) 262-9127
(510) 262-0800
http://www.peptidelab.com

Peptides International
11621 Electron Drive
Louisville, KY 40299
(800) 777-4779 FAX: (502) 267-1329
(502) 266-8787
http://www.pepnet.com

Perceptive Science Instruments
2525 South Shore Boulevard, Suite 100
League City, TX 77573
(281) 334-3027 FAX: (281) 538-2222
http://www.persci.com

Perimed
4873 Princeton Drive
North Royalton, OH 44133
(440) 877-0537 FAX: (440) 877-0534
http://www.perimed.se

Perkin-Elmer
761 Main Avenue
Norwalk, CT 06859
(800) 762-4002 FAX: (203) 762-6000
(203) 762-1000
http://www.perkin-elmer.com
See also PE Biosystems

PerSeptive Bioresearch Products
See PerSeptive BioSystems

PerSeptive BioSystems
500 Old Connecticut Path
Framingham, MA 01701
(800) 899-5858 FAX: (508) 383-7885
(508) 383-7700
http://www.pbio.com

PerSeptive Diagnostic
See PE Biosystems
(800) 343-1346

Pettersson Elektronik AB
Tallbacksvagen 51
S-756 45 Uppsala, Sweden
(46) 1830-3880 FAX: (46) 1830-3840
http://www.bahnhof.se/~pettersson

Pfanstiehl Laboratories, Inc.
1219 Glen Rock Avenue
Waukegan, IL 60085
(800) 383-0126 FAX: (847) 623-9173
http://www.pfanstiehl.com

PGC Scientifics
7311 Governors Way
Frederick, MD 21704
(800) 424-3300 FAX: (800) 662-1112
(301) 620-7777 FAX: (301) 620-7497
http://www.pgcscientifics.com

Pharmacia Biotech
See Amersham Pharmacia Biotech

Pharmacia Diagnostics
See Wallac

Pharmacia LKB Biotech
See Amersham Pharmacia Biotech

Pharmacia LKB Biotechnology
See Amersham Pharmacia Biotech

Pharmacia LKB Nuclear
See Wallac

Pharmaderm Veterinary Products
60 Baylis Road
Melville, NY 11747
(800) 432-6673
http://www.pharmaderm.com

Pharmed (Norton)
Norton Performance Plastics
See Saint-Gobain Performance Plastics

PharMingen
See BD PharMingen

Phenomex
2320 W. 205th Street
Torrance, CA 90501
(310) 212-0555 FAX: (310) 328-7768
http://www.phenomex.com

PHLS Centre for Applied
Microbiology and Research
See European Collection of Animal
Cell Cultures (ECACC)

Phoenix Flow Systems
11575 Sorrento Valley Road, Suite 208
San Diego, CA 92121
(800) 886-3569 FAX: (619) 259-5268
(619) 453-5095
http://www.phnxflow.com

Phoenix Pharmaceutical
4261 Easton Road, P.O. Box 6457
St. Joseph, MO 64506
(800) 759-3644 FAX: (816) 364-4969
(816) 364-5777
http://www.phoenixpharmaceutical.com

Photometrics
See Roper Scientific

Photon Technology International
1 Deerpark Drive, Suite F
Monmouth Junction, NJ 08852
(732) 329-0910 FAX: (732) 329-9069
http://www.pti-nj.com

Physik Instrumente
Polytec PI
23 Midstate Drive, Suite 212
Auburn, MA 01501
(508) 832-3456 FAX: (508) 832-0506
http://www.polytecpi.com

Physitemp Instruments
154 Huron Avenue
Clifton, NJ 07013
(800) 452-8510 FAX: (973) 779-5954
(973) 779-5577
http://www.physitemp.com

Pico Technology
The Mill House, Cambridge Street
St. Neots, Cambridgeshire
PE19 1QB, UK
(44) 1480-396-395
FAX: (44) 1480-396-296
http://www.picotech.com

Pierce Chemical
P.O. Box 117
3747 Meridian Road
Rockford, IL 61105
(800) 874-3723 FAX: (800) 842-5007
FAX: (815) 968-7316
http://www.piercenet.com

Pierce & Warriner
44, Upper Northgate Street
Chester, Cheshire CH1 4EF, UK
(44) 1244 382 525
FAX: (44) 1244 373 212
http://www.piercenet.com

Pilling Weck Surgical
420 Delaware Drive
Fort Washington, PA 19034
(800) 523-2579 FAX: (800) 332-2308
http://www.pilling-weck.com

PixelVision
A division of Cybex Computer Products
14964 NW Greenbrier Parkway
Beaverton, OR 97006
(503) 629-3210 FAX: (503) 629-3211
http://www.pixelvision.com

P.J. Noyes
P.O. Box 381
89 Bridge Street
Lancaster, NH 03584
(800) 522-2469 FAX: (603) 788-3873
(603) 788-4952
http://www.pjnoyes.com

Plas-Labs
917 E. Chilson Street
Lansing, MI 48906
(800) 866-7527 FAX: (517) 372-2857
(517) 372-7177
http://www.plas-labs.com

Plastics One
6591 Merriman Road, Southwest
P.O. Box 12004
Roanoke, VA 24018
(540) 772-7950 FAX: (540) 989-7519
http://www.plastics1.com

Platt Electric Supply
2757 6th Avenue South
Seattle, WA 98134
(206) 624-4083 FAX: (206) 343-6342
http://www.platt.com

Plexon
6500 Greenville Avenue
Suite 730
Dallas,TX 75206
(214) 369-4957 FAX: (214) 369-1775
http://www.plexoninc.com

Polaroid
784 Memorial Drive
Cambridge, MA 01239
(800) 225-1618 FAX: (800) 832-9003
(781) 386-2000
http://www.polaroid.com

Polyfiltronics
136 Weymouth St.
Rockland, MA 02370
(800) 434-7659 FAX: (781) 878-0822
(781) 878-1133
http://www.polyfiltronics.com

Polylabo Paul Block
Parc Tertiare de la Meinau
10, rue de la Durance
B.P. 36
67023 Strasbourg Cedex 1
Strasbourg, France
33-3-8865-8020
FAX: 33-3-8865-8039

PolyLC
9151 Rumsey Road, Suite 180
Columbia, MD 21045
(410) 992-5400 FAX: (410) 730-8340

Polymer Laboratories
Amherst Research Park
160 Old Farm Road
Amherst, MA 01002
(800) 767-3963 FAX: (413) 253-2476
http://www.polymerlabs.com

Polymicro Technologies
18019 North 25th Avenue
Phoenix, AZ 85023
(602) 375-4100 FAX: (602) 375-4110
http://www.polymicro.com

Polyphenols AS
Hanabryggene Technology Centre
Hanaveien 4-6
4327 Sandnes, Norway
(47) 51-62-0990
FAX: (47) 51-62-51-82
http://www.polyphenols.com

Polysciences
400 Valley Road
Warrington, PA 18976
(800) 523-2575 FAX: (800) 343-3291
http://www.polysciences.com

Polyscientific
70 Cleveland Avenue
Bayshore, NY 11706
(516) 586-0400 FAX: (516) 254-0618

Polytech Products
285 Washington Street
Somerville, MA 02143
(617) 666-5064 FAX: (617) 625-0975

Polytron
8585 Grovemont Circle
Gaithersburg, MD 20877
(301) 208-6597 FAX: (301) 208-8691
http://www.polytron.com

Popper and Sons
300 Denton Avenue
P.O. Box 128
New Hyde Park, NY 11040
(888) 717-7677 FAX: (800) 557-6773
(516) 248-0300 FAX: (516) 747-1188
http://www.popperandsons.com

Porphyrin Products
P.O. Box 31
Logan, UT 84323
(435) 753-1901 FAX: (435) 753-6731
http://www.porphyrin.com

Portex
See SIMS Portex Limited

Powderject Vaccines
585 Science Drive
Madison, WI 53711
(608) 231-3150 FAX: (608) 231-6990
http://www.powderject.com

Praxair
810 Jorie Boulevard
Oak Brook, IL 60521
(800) 621-7100
http://www.praxair.com

Precision Dynamics
13880 Del Sur Street
San Fernando, CA 91340
(800) 847-0670 FAX: (818) 899-4-45
http://www.pdcorp.com

Precision Scientific Laboratory
Equipment
Division of Jouan
170 Marcel Drive
Winchester, VA 22602
(800) 621-8820 FAX: (540) 869-0130
(540) 869-9892
http://www.precisionsci.com

Primary Care Diagnostics
See Becton Dickinson Primary
Care Diagnostics

Primate Products
1755 East Bayshore Road, Suite 28A
Redwood City, CA 94063
(650) 368-0663 FAX: (650) 368-0665
http://www.primateproducts.com

5 Prime → 3 Prime
See 2000 Eppendorf-5 Prime
http://www.5prime.com

Princeton Applied Research
PerkinElmer Instr.: Electrochemistry
801 S. Illinois
Oak Ridge, TN 37830
(800) 366-2741 FAX: (423) 425-1334
(423) 481-2442
http://www.eggpar.com

Princeton Instruments
A division of Roper Scientific
3660 Quakerbridge Road
Trenton, NJ 08619
(609) 587-9797 FAX: (609) 587-1970
http://www.prinst.com

Princeton Separations
P.O. Box 300
Aldephia, NJ 07710
(800) 223-0902 FAX: (732) 431-3768
(732) 431-3338

Prior Scientific
80 Reservoir Park Drive
Rockland, MA 02370
(781) 878-8442 FAX: (781) 878-8736
http://www.prior.com

PRO Scientific
P.O. Box 448
Monroe, CT 06468
(203) 452-9431 FAX: (203) 452-9753
http://www.proscientific.com

Professional Compounding Centers of America
9901 South Wilcrest Drive
Houston, TX 77099
(800) 331-2498 FAX: (281) 933-6227
(281) 933-6948
http://www.pccarx.com

Progen Biotechnik
Maass-Str. 30
69123 Heidelberg, Germany
(49) 6221-8278-0
FAX: (49) 6221-8278-23
http://www.progen.de

Prolabo
A division of Merck Eurolab
54 rue Roger Salengro
94126 Fontenay Sous Bois Cedex
France
33-1-4514-8500
FAX: 33-1-4514-8616
http://www.prolabo.fr

Proligo
2995 Wilderness Place
Boulder, CO 80301
(888) 80-OLIGO FAX: (303) 801-1134
http://www.proligo.com

Promega
2800 Woods Hollow Road
Madison, WI 53711
(800) 356-9526 FAX: (800) 356-1970
(608) 274-4330 FAX: (608) 277-2516
http://www.promega.com

Protein Databases (PDI)
405 Oakwood Road
Huntington Station, NY 11746
(800) 777-6834 FAX: (516) 673-4502
(516) 673-3939

Protein Polymer Technologies
10655 Sorrento Valley Road
San Diego, CA 92121
(619) 558-6064 FAX: (619) 558-6477
http://www.ppti.com

Protein Solutions
391 G Chipeta Way
Salt Lake City, UT 84108
(801) 583-9301 FAX: (801) 583-4463
http://www.proteinsolutions.com

Prozyme
1933 Davis Street, Suite 207
San Leandro, CA 94577
(800) 457-9444 FAX: (510) 638-6919
(510) 638-6900
http://www.prozyme.com

PSI
See Perceptive Science Instruments

Pulmetrics Group
82 Beacon Street
Chestnut Hill, MA 02167
(617) 353-3833 FAX: (617) 353-6766

Purdue Frederick
100 Connecticut Avenue
Norwalk, CT 06850
(800) 633-4741 FAX: (203) 838-1576
(203) 853-0123
http://www.pharma.com

Purina Mills
LabDiet
P. O. Box 66812
St. Louis, MO 63166
(800) 227-8941 FAX: (314) 768-4894
http://www.purina-mills.com

Qbiogene
2251 Rutherford Road
Carlsbad, CA 92008
(800) 424-6101 FAX: (760) 918-9313
http://www.qbiogene.com

Qiagen
28159 Avenue Stanford
Valencia, CA 91355
(800) 426-8157 FAX: (800) 718-2056
http://www.qiagen.com

Quality Biological
7581 Lindbergh Drive
Gaithersburg, MD 20879
(800) 443-9331 FAX: (301) 840-5450
(301) 840-9331
http://www.qualitybiological.com

Quantitative Technologies
P.O. Box 470
Salem Industrial Park, Bldg. 5
Whitehouse, NJ 08888
(908) 534-4445 FAX: 534-1054
http://www.qtionline.com

Quantum Appligene
Parc d'Innovation
Rue Geller de Kayserberg
67402 Illkirch, Cedex, France
(33) 3-8867-5425
FAX: (33) 3-8867-1945
http://www.quantum-appligene.com

Quantum Biotechnologies
See Qbiogene

Quantum Soft
Postfach 6613
CH-8023
Zürich, Switzerland
FAX: 41-1-481-69-51
profit@quansoft.com

Questcor Pharmaceuticals
26118 Research Road
Hayward, CA 94545
(510) 732-5551 FAX: (510) 732-7741
http://www.questcor.com

Quidel
10165 McKellar Court
San Diego, CA 92121
(800) 874-1517 FAX: (858) 546-8955
(858) 552-1100
http://www.quidel.com

R-Biopharm
7950 Old US 27 South
Marshall, MI 49068
(616) 789-3033 FAX: (616) 789-3070
http://www.r-biopharm.com

R. C. Electronics
6464 Hollister Avenue
Santa Barbara, CA 93117
(805) 685-7770 FAX: (805) 685-5853
http://www.rcelectronics.com

R & D Systems
614 McKinley Place NE
Minneapolis, MN 55413
(800) 343-7475 FAX: (612) 379-6580
(612) 379-2956
http://www.rndsystems.com

R & S Technology
350 Columbia Street
Peacedale, RI 02880
(401) 789-5660 FAX: (401) 792-3890
http://www.septech.com

RACAL Health and Safety
See 3M
7305 Executive Way
Frederick, MD 21704
(800) 692-9500 FAX: (301) 695-8200

Radiometer America
811 Sharon Drive
Westlake, OH 44145
(800) 736-0600 FAX: (440) 871-2633
(440) 871-8900
http://www.rameusa.com

Radiometer A/S
The Chemical Reference Laboratory
kandevej 21
DK-2700 Brnshj, Denmark
45-3827-3827 FAX: 45-3827-2727

Radionics
22 Terry Avenue
Burlington, MA 01803
(781) 272-1233 FAX: (781) 272-2428
http://www.radionics.com

Radnoti Glass Technology
227 W. Maple Avenue
Monrovia, CA 91016
(800) 428-l4l6 FAX: (626) 303-2998
(626) 357-8827
http://www.radnoti.com

Rainin Instrument
Rainin Road
P.O. Box 4026
Woburn, MA 01888
(800)-4-RAININ FAX: (781) 938-1152
(781) 935-3050
http://www.rainin.com

Rank Brothers
56 High Street
Bottisham, Cambridge
CB5 9DA UK
(44) 1223 811369
FAX: (44) 1223 811441
http://www.rankbrothers.com

Rapp Polymere
Ernst-Simon Strasse 9
D 72072 Tübingen, Germany
(49) 7071-763157
FAX: (49) 7071-763158
http://www.rapp-polymere.com

Raven Biological Laboratories
8607 Park Drive
P.O. Box 27261
Omaha, NE 68127
(800) 728-5702 FAX: (402) 593-0995
(402) 593-0781
http://www.ravenlabs.com

Razel Scientific Instruments
100 Research Drive
Stamford, CT 06906
(203) 324-9914 FAX: (203) 324-5568

RBI
See Research Biochemicals

Reagents International
See Biotech Source

Receptor Biology
10000 Virginia Manor Road, Suite 360
Beltsville, MD 20705
(888) 707-4200 FAX: (301) 210-6266
(301) 210-4700
http://www.receptorbiology.com

Regis Technologies
8210 N. Austin Avenue
Morton Grove, IL 60053
(800) 323-8144 FAX: (847) 967-1214
(847) 967-6000
http://www.registech.com

Reichert Ophthalmic Instruments
P.O. Box 123
Buffalo, NY 14240
(716) 686-4500 FAX: (716) 686-4545
http://www.reichert.com

Reiss
1 Polymer Place
P.O. Box 60
Blackstone, VA 23824
(800) 356-2829 FAX: (804) 292-1757
(804) 292-1600
http://www.reissmfg.com

Remel
12076 Santa Fe Trail Drive
P.O. Box 14428
Shawnee Mission, KS 66215
(800) 255-6730 FAX: (800) 621-8251
(913) 888-0939 FAX: (913) 888-5884
http://www.remelinc.com

Reming Bioinstruments
6680 County Route 17
Redfield, NY 13437
(315) 387-3414 FAX: (315) 387-3415

RepliGen
117 Fourth Avenue
Needham, MA 02494
(800) 622-2259 FAX: (781) 453-0048
(781) 449-9560
http://www.repligen.com

Research Biochemicals
1 Strathmore Road
Natick, MA 01760
(800) 736-3690 FAX: (800) 736-2480
(508) 651-8151 FAX: (508) 655-1359
http://www.resbio.com

Research Corporation Technologies
101 N. Wilmot Road, Suite 600
Tucson, AZ 85711
(520) 748-4400 FAX: (520) 748-0025
http://www.rctech.com

Research Diagnostics
Pleasant Hill Road
Flanders, NJ 07836
(800) 631-9384 FAX: (973) 584-0210
(973) 584-7093
http://www.researchd.com

Research Diets
121 Jersey Avenue
New Brunswick, NJ 08901
(877) 486-2486 FAX: (732) 247-2340
(732) 247-2390
http://www.researchdiets.com

Research Genetics
2130 South Memorial Parkway
Huntsville, AL 35801
(800) 533-4363 FAX: (256) 536-9016
(256) 533-4363
http://www.resgen.com

Research Instruments
Kernick Road Pernryn
Cornwall TR10 9DQ, UK
(44) 1326-372-753
FAX: (44) 1326-378-783
http://www.research-instruments.com

Research Organics
4353 E. 49th Street
Cleveland, OH 44125
(800) 321-0570 FAX: (216) 883-1576
(216) 883-8025
http://www.resorg.com

Research Plus
P.O. Box 324
Bayonne, NJ 07002
(800) 341-2296 FAX: (201) 823-9590
(201) 823-3592
http://www.researchplus.com

Research Products International
410 N. Business Center Drive
Mount Prospect, IL 60056
(800) 323-9814 FAX: (847) 635-1177
(847) 635-7330
http://www.rpicorp.com

Research Triangle Institute
P.O. Box 12194
Research Triangle Park, NC 27709
(919) 541-6000 FAX: (919) 541-6515
http://www.rti.org

Restek
110 Benner Circle
Bellefonte, PA 16823
(800) 356-1688 FAX: (814) 353-1309
(814) 353-1300
http://www.restekcorp.com

Rheodyne
P.O. Box 1909
Rohnert Park, CA 94927
(707) 588-2000 FAX: (707) 588-2020
http://www.rheodyne.com

Rhone Merieux
See Merial Limited

Rhone-Poulenc
2 T W Alexander Drive
P.O. Box 12014
Research Triangle Park, NC 08512
(919) 549-2000 FAX: (919) 549-2839
http://www.Rhone-Poulenc.com
Also see Aventis

Rhone-Poulenc Rorer
500 Arcola Road
Collegeville, PA 19426
(800) 727-6737 FAX: (610) 454-8940
(610) 454-8975
http://www.rp-rorer.com

Rhone-Poulenc Rorer
Centre de Recherche de Vitry-Alfortville
13 Quai Jules Guesde, BP14 94403
Vitry Sur Seine, Cedex, France
(33) 145-73-85-11
FAX: (33) 145-73-81-29
http://www.rp-rorer.com

Ribi ImmunoChem Research
563 Old Corvallis Road
Hamilton, MT 59840
(800) 548-7424 FAX: (406) 363-6129
(406) 363-3131
http://www.ribi.com

RiboGene
See Questcor Pharmaceuticals

Ricca Chemical
448 West Fork Drive
Arlington, TX 76012
(888) GO-RICCA FAX: (800) RICCA-93
(817) 461-5601
http://www.riccachemical.com

Richard-Allan Scientific
225 Parsons Street
Kalamazoo, MI 49007
(800) 522-7270 FAX: (616) 345-3577
(616) 344-2400
http://www.rallansci.com

Richelieu Biotechnologies
11 177 Hamon
Montral, Quebec
H3M 3E4 Canada
(802) 863-2567 FAX: (802) 862-2909
http://www.richelieubio.com

Richter Enterprises
20 Lake Shore Drive
Wayland, MA 01778
(508) 655-7632 FAX: (508) 652-7264
http://www.richter-enterprises.com

Riese Enterprises
BioSure Division
12301 G Loma Rica Drive
Grass Valley, CA 95945
(800) 345-2267 FAX: (916) 273-5097
(916) 273-5095
http://www.biosure.com

Robbins Scientific
1250 Elko Drive
Sunnyvale, CA 94086
(800) 752-8585 FAX: (408) 734-0300
(408) 734-8500
http://www.robsci.com

Roboz Surgical Instruments
9210 Corporate Boulevard, Suite 220
Rockville, MD 20850
(800) 424-2984 FAX: (301) 590-1290
(301) 590-0055

Roche Diagnostics
9115 Hague Road
P.O. Box 50457
Indianapolis, IN 46256
(800) 262-1640 FAX: (317) 845-7120
(317) 845-2000
http://www.roche.com

Roche Molecular Systems
See Roche Diagnostics

Rocklabs
P.O. Box 18-142
Auckland 6, New Zealand
(64) 9-634-7696
FAX: (64) 9-634-7696
http://www.rocklabs.com

Rockland
P.O. Box 316
Gilbertsville, PA 19525
(800) 656-ROCK FAX: (610) 367-7825
(610) 369-1008
http://www.rockland-inc.com

Rohm
Chemische Fabrik
Kirschenallee
D-64293 Darmstadt, Germany
(49) 6151-1801 FAX: (49) 6151-1802
http://www.roehm.com

Roper Scientific
3440 East Brittania Drive, Suite 100
Tucson, AZ 85706
(520) 889-9933 FAX: (520) 573-1944
http://www.roperscientific.com

Rosetta Inpharmatics
12040 115th Avenue NE
Kirkland, WA 98034
(425) 820-8900 FAX: (425) 820-5757
http://www.rii.com

ROTH-SOCHIEL
3 rue de la Chapelle
Lauterbourg
67630 France
(33) 03-88-94-82-42
FAX: (33) 03-88-54-63-93

Rotronic Instrument
160 E. Main Street
Huntington, NY 11743
(631) 427-3898 FAX: (631) 427-3902
http://www.rotronic-usa.com

Roundy's
23000 Roundy Drive
Pewaukee, WI 53072
(262) 953-7999 FAX: (262) 953-7989
http://www.roundys.com

RS Components
Birchington Road
Weldon Industrial Estate
Corby, Northants NN17 9RS, UK
(44) 1536 201234
FAX: (44) 1536 405678
http://www.rs-components.com

Rubbermaid
See Newell Rubbermaid

SA Instrumentation
1437 Tzena Way
Encinitas, CA 92024
(858) 453-1776 FAX: (800) 266-1776
http://www.sainst.com

Safe Cells
See Bionique Testing Labs

Sage Instruments
240 Airport Boulevard
Freedom, CA 95076
831-761-1000 FAX: 831-761-1008
http://www.sageinst.com

Sage Laboratories
11 Huron Drive
Natick, MA 01760
(508) 653-0844 FAX: 508-653-5671
http://www.sagelabs.com

Saint-Gobain Performance Plastics
P.O. Box 3660
Akron, OH 44309
(330) 798-9240 FAX: (330) 798-6968
http://www.nortonplastics.com

San Diego Instruments
7758 Arjons Drive
San Diego, CA 92126
(858) 530-2600 FAX: (858) 530-2646
http://www.sd-inst.com

Sandown Scientific
Beards Lodge
25 Oldfield Road
Hampden, Middlesex TW12 2AJ, UK
(44) 2089 793300
FAX: (44) 2089 793311
http://www.sandownsci.com

Sandoz Pharmaceuticals
See Novartis

Sanofi Recherche
Centre de Montpellier
371 Rue du Professor Blayac
34184 Montpellier, Cedex 04
France
(33) 67-10-67-10
FAX: (33) 67-10-67-67

Sanofi Winthrop Pharmaceuticals
90 Park Avenue
New York, NY 10016
(800) 223-5511 FAX: (800) 933-3243
(212) 551-4000
http://www.sanofi-synthelabo.com/us

Santa Cruz Biotechnology
2161 Delaware Avenue
Santa Cruz, CA 95060
(800) 457-3801 FAX: (831) 457-3801
(831) 457-3800
http://www.scbt.com

Sarasep
(800) 605-0267 FAX: (408) 432-3231
(408) 432-3230
http://www.transgenomic.com

Sarstedt
P.O. Box 468
Newton, NC 28658
(800) 257-5101 FAX: (828) 465-4003
(828) 465-4000
http://www.sarstedt.com

Sartorius
131 Heartsland Boulevard
Edgewood, NY 11717
(800) 368-7178 FAX: (516) 254-4253
http://www.sartorius.com

SAS Institute
Pacific Telesis Center
One Montgomery Street
San Francisco, CA 94104
(415) 421-2227 FAX: (415) 421-1213
http://www.sas.com

Savant/EC Apparatus
A ThermoQuest company
100 Colin Drive
Holbrook, NY 11741
(800) 634-8886 FAX: (516) 244-0606
(516) 244-2929
http://www.savec.com

Savillex
6133 Baker Road
Minnetonka, MN 55345
(612) 935-5427

Scanalytics
Division of CSP
8550 Lee Highway, Suite 400
Fairfax, VA 22031
(800) 325-3110 FAX: (703) 208-1960
(703) 208-2230
http://www.scanalytics.com

Schering Laboratories
See Schering-Plough

Schering-Plough
1 Giralda Farms
Madison, NJ 07940
(800) 222-7579 FAX: (973) 822-7048
(973) 822-7000
http://www.schering-plough.com

Schleicher & Schuell
10 Optical Avenue
Keene, NH 03431
(800) 245-4024 FAX: (603) 357-3627
(603) 352-3810
http://www.s-und-s.de/english-index.html

Science Technology Centre
1250 Herzberg Laboratories
Carleton University
1125 Colonel Bay Drive
Ottawa, Ontario
K1S 5B6 Canada
(613) 520-4442 FAX: (613) 520-4445
http://www.carleton.ca/universities/stc

Scientific Instruments
200 Saw Mill River Road
Hawthorne, NY 10532
(800) 431-1956 FAX: (914) 769-5473
(914) 769-5700
http://www.scientificinstruments.com

Scientific Solutions
9323 Hamilton
Mentor, OH 44060
(440) 357-1400 FAX: (440) 357-1416
http://www.labmaster.com

Scion
82 Worman's Mill Court, Suite H
Frederick, MD 21701
(301) 695-7870 FAX: (301) 695-0035
http://www.scioncorp.com

Scott Specialty Gases
6141 Easton Road
P.O. Box 310
Plumsteadville, PA 18949
(800) 21-SCOTT FAX: (215) 766-2476
(215) 766-8861
http://www.scottgas.com

Scripps Clinic and Research Foundation
Instrumentation and Design Lab
10666 N. Torrey Pines Road
La Jolla, CA 92037
(800) 992-9962 FAX: (858) 554-8986
(858) 455-9100
http://www.scrippsclinic.com

SDI Sensor Devices
407 Pilot Court, 400A
Waukesha, WI 53188
(414) 524-1000 FAX: (414) 524-1009

Sefar America
111 Calumet Street
Depew, NY 14043
(716) 683-4050 FAX: (716) 683-4053
http://www.sefaramerica.com

Seikagaku America
Division of Associates of Cape Cod
704 Main Street
Falmouth, MA 02540
(800) 237-4512 FAX: (508) 540-8680
(508) 540-3444
http://www.seikagaku.com

Sellas Medizinische Gerate
Hagener Str. 393
Gevelsberg-Vogelsang, 58285
Germany
(49) 23-326-1225

Sensor Medics
22705 Savi Ranch Parkway
Yorba Linda, CA 92887
(800) 231-2466 FAX: (714) 283-8439
(714) 283-2228
http://www.sensormedics.com

Sensor Systems LLC
2800 Anvil Street, North
Saint Petersburg, FL 33710
(800) 688-2181 FAX: (727) 347-3881
(727) 347-2181
http://www.vsensors.com

SenSym/Foxboro ICT
1804 McCarthy Boulevard
Milpitas, CA 95035
(800) 392-9934 FAX: (408) 954-9458
(408) 954-6700
http://www.sensym.com

Separations Group
See Vydac

Sepracor
111 Locke Drive
Marlboro, MA 01752
(877)-SEPRACOR (508) 357-7300
http://www.sepracor.com

Sera-Lab
See Harlan Sera-Lab

Sermeter
925 Seton Court, #7
Wheeling, IL 60090
(847) 537-4747

Serological
195 W. Birch Street
Kankakee, IL 60901
(800) 227-9412 FAX: (815) 937-8285
(815) 937-8270

Seromed Biochrom
Leonorenstrasse 2-6
D-12247 Berlin, Germany
(49) 030-779-9060

Serotec
22 Bankside
Station Approach
Kidlington, Oxford OX5 1JE, UK
(44) 1865-852722
FAX: (44) 1865-373899
In the US: (800) 265-7376
http://www.serotec.co.uk

Serva Biochemicals
Distributed by Crescent Chemical

S.F. Medical Pharmlast
See Chase-Walton Elastomers

SGE
2007 Kramer Lane
Austin, TX 78758
(800) 945-6154 FAX: (512) 836-9159
(512) 837-7190
http://www.sge.com

Shandon/Lipshaw
171 Industry Drive
Pittsburgh, PA 15275
(800) 245-6212 FAX: (412) 788-1138
(412) 788-1133
http://www.shandon.com

Sharpoint
P.O. Box 2212
Taichung, Taiwan
Republic of China
(886) 4-3206320
FAX: (886) 4-3289879
http://www.sharpoint.com.tw

Shelton Scientific
230 Longhill Crossroads
Shelton, CT 06484
(800) 222-2092 FAX: (203) 929-2175
(203) 929-8999
http://www.sheltonscientific.com

Sherwood-Davis & Geck
See Kendall

Sherwood Medical
See Kendall

Shimadzu Scientific Instruments
7102 Riverwood Drive
Columbia, MD 21046
(800) 477-1227 FAX: (410) 381-1222
(410) 381-1227
http://www.ssi.shimadzu.com

Sialomed
See Amika

Siemens Analytical X-Ray Systems
See Bruker Analytical X-Ray Systems

Sievers Instruments
Subsidiary of Ionics
6060 Spine Road
Boulder, CO 80301
(800) 255-6964 FAX: (303) 444-6272
(303) 444-2009
http://www.sieversinst.com

SIFCO
970 East 46th Street
Cleveland, OH 44103
(216) 881-8600 FAX: (216) 432-6281
http://www.sifco.com

Sigma-Aldrich
3050 Spruce Street
St. Louis, MO 63103
(800) 358-5287 FAX: (800) 962-9591
(800) 325-3101 FAX: (800) 325-5052
http://www.sigma-aldrich.com

Sigma-Aldrich Canada
2149 Winston Park Drive
Oakville, Ontario
L6H 6J8 Canada
(800) 5652D1400 FAX: (800) 2652D3858
http://www.sigma-aldrich.com

Silenus/Amrad
34 Wadhurst Drive
Boronia, Victoria 3155 Australia
(613)9887-3909 FAX: (613)9887-3912
http://www.amrad.com.au

Silicon Genetics
2601 Spring Street
Redwood City, CA 94063
(866) SIG SOFT FAX: (650) 365 1735
(650) 367 9600
http://www.sigenetics.com

SIMS Deltec
1265 Grey Fox Road
St. Paul, Minnesota 55112
(800) 426-2448 FAX: (615) 628-7459
http://www.deltec.com

SIMS Portex
10 Bowman Drive
Keene, NH 03431
(800) 258-5361 FAX: (603) 352-3703
(603) 352-3812
http://www.simsmed.com

SIMS Portex Limited
Hythe, Kent CT21 6JL, UK
(44)1303-260551
FAX: (44)1303-266761
http://www.portex.com

Siris Laboratories
See Biosearch Technologies

Skatron Instruments
See Molecular Devices

SLM Instruments
See Spectronic Instruments

SLM-AMINCO Instruments
See Spectronic Instruments

Small Parts
13980 NW 58th Court
P.O. Box 4650
Miami Lakes, FL 33014
(800) 220-4242 FAX: (800) 423-9009
(305) 558-1038 FAX: (305) 558-0509
http://www.smallparts.com

Smith & Nephew
11775 Starkey Road
P.O. Box 1970
Largo, FL 33779
(800) 876-1261
http://www.smith-nephew.com

SmithKline Beecham
1 Franklin Plaza, #1800
Philadelphia, PA 19102
(215) 751-4000 FAX: (215) 751-4992
http://www.sb.com

Solid Phase Sciences
See Biosearch Technologies

SOMA Scientific Instruments
5319 University Drive, PMB #366
Irvine, CA 92612
(949) 854-0220 FAX: (949) 854-0223
http://somascientific.com

Somatix Therapy
See Cell Genesys

Sonics & Materials
53 Church Hill Road
Newtown, CT 06470
(800) 745-1105 FAX: (203) 270-4610
(203) 270-4600
http://www.sonicsandmaterials.com

Sonosep Biotech
See Triton Environmental Consultants

Sorvall
See Kendro Laboratory Products

Southern Biotechnology Associates
P.O. Box 26221
Birmingham, AL 35260
(800) 722-2255 FAX: (205) 945-8768
(205) 945-1774
http://SouthernBiotech.com

SPAFAS
190 Route 165
Preston, CT 06365
(800) SPAFAS-1 FAX: (860) 889-1991
(860) 889-1389
http://www.spafas.com

Specialty Media
Division of Cell & Molecular Technologies
580 Marshall Street
Phillipsburg, NJ 08865
(800) 543-6029 FAX: (908) 387-1670
(908) 454-7774
http://www.specialtymedia.com

Spectra Physics
See Thermo Separation Products

Spectramed
See BOC Edwards

SpectraSource Instruments
31324 Via Colinas, Suite 114
Westlake Village, CA 91362
(818) 707-2655 FAX: (818) 707-9035
http://www.spectrasource.com

Spectronic Instruments
820 Linden Avenue
Rochester, NY 14625
(800) 654-9955 FAX: (716) 248-4014
(716) 248-4000
http://www.spectronic.com

Spectrum Medical Industries
See Spectrum Laboratories

Spectrum Laboratories
18617 Broadwick Street
Rancho Dominguez, CA 90220
(800) 634-3300 FAX: (800) 445-7330
(310) 885-4601 FAX: (310) 885-4666
http://www.spectrumlabs.com

Spherotech
1840 Industrial Drive, Suite 270
Libertyville, IL 60048
(800) 368-0822 FAX: (847) 680-8927
(847) 680-8922
http://www.spherotech.com

SPSS
233 S. Wacker Drive, 11th floor
Chicago, IL 60606
(800) 521-1337 FAX: (800) 841-0064
http://www.spss.com

SS White Burs
1145 Towbin Avenue
Lakewood, NJ 08701
(732) 905-1100 FAX: (732) 905-0987
http://www.sswhiteburs.com

Stag Instruments
16 Monument Industrial Park
Chalgrove, Oxon OX44 7RW, UK
(44) 1865-891116
FAX: (44) 1865-890562

Standard Reference Materials
Program
National Institute of Standards and Technology
Building 202, Room 204
Gaithersburg, MD 20899
(301) 975-6776 FAX: (301) 948-3730

Starna Cells
P.O. Box 1919
Atascandero, CA 93423
(805) 466-8855 FAX: (805) 461-1575
(800) 228-4482
http://www.starnacells.com

Starplex Scientific
50 Steinway
Etobieoke, Ontario
M9W 6Y3 Canada
(800) 665-0954 FAX: (416) 674-6067
(416) 674-7474
http://www.starplexscientific.com

State Laboratory Institute of
Massachusetts
305 South Street
Jamaica Plain, MA 02130
(617) 522-3700 FAX: (617) 522-8735
http://www.state.ma.us/dph

Stedim Labs
1910 Mark Court, Suite 110
Concord, CA 94520
(800) 914-6644 FAX: (925) 689-6988
(925) 689-6650
http://www.stedim.com

Steinel America
9051 Lyndale Avenue
Bloomington, MN 55420
(800) 852 4343 FAX: (952) 888-5132
http://www.steinelamerica.com

Stem Cell Technologies
777 West Broadway, Suite 808
Vancouver, British Columbia
V5Z 4J7 Canada
(800) 667-0322 FAX: (800) 567-2899
(604) 877-0713 FAX: (604) 877-0704
http://www.stemcell.com

Stephens Scientific
107 Riverdale Road
Riverdale, NJ 07457
(800) 831-8099 FAX: (201) 831-8009
(201) 831-9800

Steraloids
P.O. Box 689
Newport, RI 02840
(401) 848-5422 FAX: (401) 848-5638
http://www.steraloids.com

Sterling Medical
2091 Springdale Road, Ste. 2
Cherry Hill, NJ 08003
(800) 229-0900 FAX: (800) 229-7854
http://www.sterlingmedical.com

Sterling Winthrop
90 Park Avenue
New York, NY 10016
(212) 907-2000 FAX: (212) 907-3626

Sternberger Monoclonals
10 Burwood Court
Lutherville, MD 21093
(410) 821-8505 FAX: (410) 821-8506
http://www.sternbergermonoclonals.com

Stoelting
502 Highway 67
Kiel, WI 53042
(920) 894-2293 FAX: (920) 894-7029
http://www.stoelting.com

Stovall Lifescience
206-G South Westgate Drive
Greensboro, NC 27407
(800) 852-0102 FAX: (336) 852-3507
http://www.slscience.com

Stratagene
11011 N. Torrey Pines Road
La Jolla, CA 92037
(800) 424-5444 FAX: (888) 267-4010
(858) 535-5400
http://www.stratagene.com

Strategic Applications
530A N. Milwaukee Avenue
Libertyville, IL 60048
(847) 680-9385 FAX: (847) 680-9837

Strem Chemicals
7 Mulliken Way
Newburyport, MA 01950
(800) 647-8736 FAX: (800) 517-8736
(978) 462-3191 FAX: (978) 465-3104
http://www.strem.com

StressGen Biotechnologies
Biochemicals Division
120-4243 Glanford Avenue
Victoria, British Columbia
V8Z 4B9 Canada
(800) 661-4978 FAX: (250) 744-2877
(250) 744-2811
http://www.stressgen.com

Structure Probe/SPI Supplies
(Epon-Araldite)
P.O. Box 656
West Chester, PA 19381
(800) 242-4774 FAX: (610) 436-5755
http://www.2spi.com

Süd-Chemie Performance Packaging
101 Christine Drive
Belen, NM 87002
(800) 989-3374 FAX: (505) 864-9296
http://www.uniteddesiccants.com

Sumitomo Chemical
Sumitomo Building
5-33, Kitahama 4-chome
Chuo-ku, Osaka 541-8550, Japan
(81) 6-6220-3891
FAX: (81)-6-6220-3345
http://www.sumitomo-chem.co.jp

Sun Box
19217 Orbit Drive
Gaithersburg, MD 20879
(800) 548-3968 FAX: (301) 977-2281
(301) 869-5980
http://www.sunboxco.com

Sunbrokers
See Sun International

Sun International
3700 Highway 421 North
Wilmington, NC 28401
(800) LAB-VIAL FAX: (800) 231-7861
http://www.autosamplervial.com

Sunox
1111 Franklin Boulevard, Unit 6
Cambridge, Ontario
N1R 8B5 Canada
(519) 624-4413 FAX: (519) 624-8378
http://www.sunox.ca

Supelco
See Sigma-Aldrich

SuperArray
P.O. Box 34494
Bethesda, MD 20827
(888) 503-3187 FAX: (301) 765-9859
(301) 765-9888
http://www.superarray.com

Surface Measurement Systems
3 Warple Mews, Warple Way
London W3 ORF, UK
(44) 20-8749-4900
FAX: (44) 20-8749-6749
http://www.smsuk.co.uk/index.htm

SurgiVet
N7 W22025 Johnson Road, Suite A
Waukesha, WI 53186
(262) 513-8500 (888) 745-6562
FAX: (262) 513-9069
http://www.surgivet.com

Sutter Instruments
51 Digital Drive
Novato, CA 94949
(415) 883-0128 FAX: (415) 883-0572
http://www.sutter.com

Swiss Precision Instruments
1555 Mittel Boulevard, Suite F
Wooddale, IL 60191
(800) 221-0198 FAX: (800) 842-5164

Synaptosoft
3098 Anderson Place
Decatur, GA 30033
(770) 939-4366 FAX: 770-939-9478
http://www.synaptosoft.com

SynChrom
See Micra Scientific

Synergy Software
2457 Perkiomen Avenue
Reading, PA 19606
(800) 876-8376 FAX: (610) 370-0548
(610) 779-0522
http://www.synergy.com

Synteni
See Incyte

Synthetics Industry
Lumite Division
2100A Atlantic Highway
Gainesville, GA 30501
(404) 532-9756 FAX: (404) 531-1347

Systat
See SPSS

Systems Planning and Analysis (SPA)
2000 N. Beauregard Street
Suite 400
Alexandria, VA 22311
(703) 931-3500
http://www.spa-inc.net

3M Bioapplications
3M Center
Building 270-15-01
St. Paul, MN 55144
(800) 257-7459 FAX: (651) 737-5645
(651) 736-4946

T Cell Diagnostics and T Cell Sciences
38 Sidney Street
Cambridge, MA 02139
(617) 621-1400

TAAB Laboratory Equipment
3 Minerva House
Calleva Park
Aldermaston, Berkshire RG7 8NA, UK
(44) 118 9817775
FAX: (44) 118 9817881

Taconic
273 Hover Avenue
Germantown, NY 12526
(800) TAC-ONIC FAX: (518) 537-7287
(518) 537-6208
http://www.taconic.com

Tago
See Biosource International

TaKaRa Biochemical
719 Alliston Way
Berkeley, CA 94710
(800) 544-9899 FAX: (510) 649-8933
(510) 649-9895
http://www.takara.co.jp/english

Takara Shuzo
Biomedical Group Division
Seta 3-4-1
Otsu Shiga 520-21, Japan
(81) 75-241-5100
FAX: (81) 77-543-9254
http://www.Takara.co.jp/english

Takeda Chemical Products
101 Takeda Drive
Wilmington, NC 28401
(800) 825-3328 FAX: (800) 825-0333
(910) 762-8666 FAX: (910) 762-6846
http://takeda-usa.com

TAO Biomedical
73 Manassas Court
Laurel Springs, NJ 08021
(609) 782-8622 FAX: (609) 782-8622

Tecan US
P.O. Box 13953
Research Triangle Park, NC 27709
(800) 33-TECAN FAX: (919) 361-5201
(919) 361-5208
http://www.tecan-us.com

Techne
University Park Plaza
743 Alexander Road
Princeton, NJ 08540
(800) 225-9243 FAX: (609) 987-8177
(609) 452-9275
http://www.techneusa.com

Technical Manufacturing
15 Centennial Drive
Peabody, MA 01960
(978) 532-6330 FAX: (978) 531-8682
http://www.techmfg.com

Technical Products International
5918 Evergreen
St. Louis, MO 63134
(800) 729-4451 FAX: (314) 522-6360
(314) 522-8671
http://www.vibratome.com

Technicon
See Organon Teknika Cappel

Techno-Aide
P.O. Box 90763
Nashville, TN 37209
(800) 251-2629 FAX: (800) 554-6275
(615) 350-7030
http://www.techno-aid.com

Ted Pella
4595 Mountain Lakes Boulevard
P.O. Box 492477
Redding, CA 96049
(800) 237-3526 FAX: (530) 243-3761
(530) 243-2200
http://www.tedpella.com

Tekmar-Dohrmann
P.O. Box 429576
Cincinnati, OH 45242
(800) 543-4461 FAX: (800) 841-5262
(513) 247-7000 FAX: (513) 247-7050

Tektronix
142000 S.W. Karl Braun Drive
Beaverton, OR 97077
(800) 621-1966 FAX: (503) 627-7995
(503) 627-7999
http://www.tek.com

Tel-Test
P.O. Box 1421
Friendswood, TX 77546
(800) 631-0600 FAX: (281)482-1070
(281)482-2672
http://www.isotex-diag.com

TeleChem International
524 East Weddell Drive, Suite 3
Sunnyvale, CA 94089
(408) 744-1331 FAX: (408) 744-1711
http://www.gst.net/~telechem

Terrachem
Mallaustrasse 57
D-68219 Mannheim, Germany
0621-876797-0 FAX: 0621-876797-19
http://www.terrachem.de

Terumo Medical
2101 Cottontail Lane
Somerset, NJ 08873
(800) 283-7866 FAX: (732) 302-3083
(732) 302-4900
http://www.terumomedical.com

Tetko
333 South Highland Manor
Briarcliff, NY 10510
(800) 289-8385 FAX: (914) 941-1017
(914) 941-7767
http://www.tetko.com

TetraLink
4240 Ridge Lea Road
Suite 29
Amherst, NY 14226
(800) 747-5170 FAX: (800) 747-5171
http://www.tetra-link.com

TEVA Pharmaceuticals USA
1090 Horsham Road
P.O. Box 1090
North Wales, PA 19454
(215) 591-3000 FAX: (215) 721-9669
http://www.tevapharmusa.com

Texas Fluorescence Labs
9503 Capitol View Drive
Austin, TX 78747
(512) 280-5223 FAX: (512) 280-4997
http://www.teflabs.com

The Nest Group
45 Valley Road
Southborough, MA 01772
(800) 347-6378 FAX: (508) 485-5736
(508) 481-6223
http://world.std.com/~nestgrp

ThermoCare
P.O. Box 6069
Incline Village, NV 89450
(800) 262-4020
(775) 831-1201

Thermo Labsystems
8 East Forge Parkway
Franklin, MA 02038
(800) 522-7763 FAX: (508) 520-2229
(508) 520-0009
http://www.finnpipette.com

Thermometric
Spjutvagen 5A
S-175 61 Jarfalla, Sweden
(46) 8-564-72-200

Thermoquest
IEC Division
300 Second Avenue
Needham Heights, MA 02194
(800) 843-1113 FAX: (781) 444-6743
(781) 449-0800
http://www.thermoquest.com

Thermo Separation Products
Thermoquest
355 River Oaks Parkway
San Jose, CA 95134
(800) 538-7067 FAX: (408) 526-9810
(408) 526-1100
http://www.thermoquest.com

Thermo Shandon
171 Industry Drive
Pittsburgh, PA 15275
(800) 547-7429 FAX: (412) 899-4045
http://www.thermoshandon.com

Thermo Spectronic
820 Linden Avenue
Rochester, NY 14625
(585) 248-4000 FAX: (585) 248-4200
http://www.thermo.com

Thomas Scientific
99 High Hill Road at I-295
Swedesboro, NJ 08085
(800) 345-2100 FAX: (800) 345-5232
(856) 467-2000 FAX: (856) 467-3087
http://www.wheatonsci.com/html/nt/Thomas.html

Thomson Instrument
354 Tyler Road
Clearbrook, VA 22624
(800) 842-4752 FAX: (540) 667-6878
(800) 541-4792 FAX: (760) 757-9367
http://www.hplc.com

Thorn EMI
See Electron Tubes

Thorlabs
435 Route 206
Newton, NJ 07860
(973) 579-7227 FAX: (973) 383-8406
http://www.thorlabs.com

Tiemann
See Bernsco Surgical Supply

Timberline Instruments
1880 South Flatiron Court, H-2
P.O. Box 20356
Boulder, CO 80308
(800) 777-5996 FAX: (303) 440-8786
(303) 440-8779
http://www.timberlineinstruments.com

TissueInformatics
711 Bingham Street, Suite 202
Pittsburgh, PA 15203
(418) 488-1100 FAX: (418) 488-6172
http://www.tissueinformatics.com

Tissue-Tek
A Division of Sakura Finetek USA
1750 West 214th Street
Torrance, CA 90501
(800) 725-8723 FAX: (310) 972-7888
(310) 972-7800
http://www.sakuraus.com

Tocris Cookson
114 Holloway Road, Suite 200
Ballwin, MO 63011
(800) 421-3701 FAX: (800) 483-1993
(636) 207-7651 FAX: (636) 207-7683
http://www.tocris.com

Tocris Cookson
Northpoint, Fourth Way
Avonmouth, Bristol BS11 8TA, UK
(44) 117-982-6551
FAX: (44) 117-982-6552
http://www.tocris.com

Tomtec
See CraMar Technologies

TopoGen
P.O. Box 20607
Columbus, OH 43220
(800) TOPOGEN
FAX: (800) ADD-TOPO
(614) 451-5810 FAX: (614) 451-5811
http://www.topogen.com

Toray Industries, Japan
Toray Building 2-1
Nihonbash-Muromach
2-Chome, Chuo-Ku
Tokyo, Japan 103-8666
(03) 3245-5115 FAX: (03) 3245-5555
http://www.toray.co.jp

Toray Industries, U.S.A.
600 Third Avenue
New York, NY 10016
(212) 697-8150 FAX: (212) 972-4279
http://www.toray.com

Toronto Research Chemicals
2 Brisbane Road
North York, Ontario
M3J 2J8 Canada
(416) 665-9696 FAX: (416) 665-4439
http://www.trc-canada.com

TosoHaas
156 Keystone Drive
Montgomeryville, PA 18036
(800) 366-4875 FAX: (215) 283-5035
(215) 283-5000
http://www.tosohaas.com

Towhill
647 Summer Street
Boston, MA 02210
(617) 542-6636 FAX: (617) 464-0804

Toxin Technology
7165 Curtiss Avenue
Sarasota, FL 34231
(941) 925-2032 FAX: (9413) 925-2130
http://www.toxintechnology.com

Toyo Soda
See TosoHaas

Trace Analytical
3517-A Edison Way
Menlo Park, CA 94025
(650) 364-6895 FAX: (650) 364-6897
http://www.traceanalytical.com

Transduction Laboratories
See BD Transduction Laboratories

Transgenomic
2032 Concourse Drive
San Jose, CA 95131
(408) 432-3230 FAX: (408) 432-3231
http://www.transgenomic.com

Transonic Systems
34 Dutch Mill Road
Ithaca, NY 14850
(800) 353-3569 FAX: (607) 257-7256
http://www.transonic.com

Travenol Lab
See Baxter Healthcare

Tree Star Software
20 Winding Way
San Carlos, CA 94070
800-366-6045
http://www.treestar.com

Trevigen
8405 Helgerman Court
Gaithersburg, MD 20877
(800) TREVIGEN FAX: (301) 216-2801
(301) 216-2800
http://www.trevigen.com

Trilink Biotechnologies
6310 Nancy Ridge Drive
San Diego, CA 92121
(800) 863-6801 FAX: (858) 546-0020
http://www.trilink.biotech.com

Tripos Associates
1699 South Hanley Road, Suite 303
St. Louis, MO 63144
(800) 323-2960 FAX: (314) 647-9241
(314) 647-1099
http://www.tripos.com

Triton Environmental Consultants
120-13511 Commerce Parkway
Richmond, British Columbia
V6V 2L1 Canada
(604) 279-2093 FAX: (604) 279-2047
http://www.triton-env.com

Tropix
47 Wiggins Avenue
Bedford, MA 01730
(800) 542-2369 FAX: (617) 275-8581
(617) 271-0045
http://www.tropix.com

TSI Center for Diagnostic Products
See Intergen

2000 Eppendorf-5 Prime
5603 Arapahoe Avenue
Boulder, CO 80303
(800) 533-5703 FAX: (303) 440-0835
(303) 440-3705

Tyler Research
10328 73rd Avenue
Edmonton, Alberta
T6E 6N5 Canada
(403) 448-1249 FAX: (403) 433-0479

UBI
See Upstate Biotechnology

Ugo Basile Biological Research Apparatus
Via G. Borghi 43
21025 Comerio, Varese, Italy
(39) 332 744 574
FAX: (39) 332 745 488
http://www.ugobasile.com

UltraPIX
See Life Science Resources

Ultrasonic Power
239 East Stephenson Street
Freeport, IL 61032
(815) 235-6020 FAX: (815) 232-2150
http://www.upcorp.com

Ultrasound Advice
23 Aberdeen Road
London N52UG, UK
(44) 020-7359-1718
FAX: (44) 020-7359-3650
http://www.ultrasoundadvice.co.uk

UNELKO
14641 N. 74th Street
Scottsdale, AZ 85260
(480) 991-7272 FAX: (480)483-7674
http://www.unelko.com

Unifab Corp.
5260 Lovers Lane
Kalamazoo, MI 49002
(800) 648-9569 FAX: (616) 382-2825
(616) 382-2803

Union Carbide
10235 West Little York Road, Suite 300
Houston, TX 77040
(800) 568-4000 FAX: (713) 849-7021
(713) 849-7000
http://www.unioncarbide.com

United Desiccants
See Süd-Chemie Performance Packaging

United States Biochemical
See USB

United States Biological (US Biological)
P.O. Box 261
Swampscott, MA 01907
(800) 520-3011 FAX: (781) 639-1768
http://www.usbio.net

Universal Imaging
502 Brandywine Parkway
West Chester, PA 19380
(610) 344-9410 FAX: (610) 344-6515
http://www.image1.com

Upchurch Scientific
619 West Oak Street
P.O. Box 1529
Oak Harbor, WA 98277
(800) 426-0191 FAX: (800) 359-3460
(360) 679-2528 FAX: (360) 679-3830
http://www.upchurch.com

Upjohn
Pharmacia & Upjohn
http://www.pnu.com

Upstate Biotechnology (UBI)
1100 Winter Street, Suite 2300
Waltham, MA 02451
(800) 233-3991 FAX: (781) 890-7738
(781) 890-8845
http://www.upstatebiotech.com

USA/Scientific
346 SW 57th Avenue
P.O. Box 3565
Ocala, FL 34478
(800) LAB-TIPS FAX: (352) 351-2057
(3524) 237-6288
http://www.usascientific.com

USB
26111 Miles Road
P.O. Box 22400
Cleveland, OH 44122
(800) 321-9322 FAX: (800) 535-0898
FAX: (216) 464-5075
http://www.usbweb.com

USCI Bard
Bard Interventional Products
129 Concord Road
Billerica, MA 01821
(800) 225-1332 FAX: (978) 262-4805
http://www.bardinterventional.com

UVP (Ultraviolet Products)
2066 W. 11th Street
Upland, CA 91786
(800) 452-6788 FAX: (909) 946-3597
(909) 946-3197
http://www.uvp.com

V & P Scientific
9823 Pacific Heights Boulevard, Suite T
San Diego, CA 92121
(800) 455-0644 FAX: (858) 455-0703
(858) 455-0643
http://www.vp-scientific.com

Valco Instruments
P.O. Box 55603
Houston, TX 77255
(800) FOR-VICI FAX: (713) 688-8106
(713) 688-9345
http://www.vici.com

Valpey Fisher
75 South Street
Hopkin, MA 01748
(508) 435-6831 FAX: (508) 435-5289
http://www.valpeyfisher.com

Value Plastics
3325 Timberline Road
Fort Collins, CO 80525
(800) 404-LUER FAX: (970) 223-0953
(970) 223-8306
http://www.valueplastics.com

Vangard International
P.O. Box 308
3535 Rt. 66, Bldg. #4
Neptune, NJ 07754
(800) 922-0784 FAX: (732) 922-0557
(732) 922-4900
http://www.vangard1.com

Varian Analytical Instruments
2700 Mitchell Drive
Walnut Creek, CA 94598
(800) 926-3000 FAX: (925) 945-2102
(925) 939-2400
http://www.varianinc.com

Varian Associates
3050 Hansen Way
Palo Alto, CA 94304
(800) 544-4636 FAX: (650) 424-5358
(650) 493-4000
http://www.varian.com

Vector Core Laboratory/
National Gene Vector Labs
University of Michigan
3560 E MSRB II
1150 West Medical Center Drive
Ann Arbor, MI 48109
(734) 936-5843 FAX: (734) 764-3596

Vector Laboratories
30 Ingold Road
Burlingame, CA 94010
(800) 227-6666 FAX: (650) 697-0339
(650) 697-3600
http://www.vectorlabs.com

Vedco
2121 S.E. Bush Road
St. Joseph, MO 64504
(888) 708-3326 FAX: (816) 238-1837
(816) 238-8840
http://database.vedco.com

Ventana Medical Systems
3865 North Business Center Drive
Tucson, AZ 85705
(800) 227-2155 FAX: (520) 887-2558
(520) 887-2155
http://www.ventanamed.com

Verity Software House
P.O. Box 247
45A Augusta Road
Topsham, ME 04086
(207) 729-6767 FAX: (207) 729-5443
http://www.vsh.com

Vernitron
See Sensor Systems LLC

Vertex Pharmaceuticals
130 Waverly Street
Cambridge, MA 02139
(617) 577-6000 FAX: (617) 577-6680
http://www.vpharm.com

Vetamac
Route 7, Box 208
Frankfort, IN 46041
(317) 379-3621

Vet Drug
Unit 8
Lakeside Industrial Estate
Colnbrook, Slough SL3 0ED, UK

Vetus Animal Health
See Burns Veterinary Supply

Viamed
15 Station Road
Cross Hills, Keighley
W. Yorkshire BD20 7DT, UK
(44) 1-535-634-542
FAX: (44) 1-535-635-582
http://www.viamed.co.uk

Vical
9373 Town Center Drive, Suite 100
San Diego, CA 92121
(858) 646-1100 FAX: (858) 646-1150
http://www.vical.com

Victor Medical
2349 North Watney Way, Suite D
Fairfield, CA 94533
(800) 888-8908 FAX: (707) 425-6459
(707) 425-0294

Virion Systems
9610 Medical Center Drive, Suite 100
Rockville, MD 20850
(301) 309-1844 FAX: (301) 309-0471
http://www.radix.net/~virion

VirTis Company
815 Route 208
Gardiner, NY 12525
(800) 765-6198 FAX: (914) 255-5338
(914) 255-5000
http://www.virtis.com

Visible Genetics
700 Bay Street, Suite 1000
Toronto, Ontario
M5G 1Z6 Canada
(888) 463-6844 (416) 813-3272
http://www.visgen.com

Vitrocom
8 Morris Avenue
Mountain Lakes, NJ 07046
(973) 402-1443 FAX: (973) 402-1445

VTI
7650 W. 26th Avenue
Hialeah, FL 33106
(305) 828-4700 FAX: (305) 828-0299
http://www.vticorp.com

VWR Scientific Products
200 Center Square Road
Bridgeport, NJ 08014
(800) 932-5000 FAX: (609) 467-5499
(609) 467-2600
http://www.vwrsp.com

Vydac
17434 Mojave Street
P.O. Box 867
Hesperia, CA 92345
(800) 247-0924 FAX: (760) 244-1984
(760) 244-6107
http://www.vydac.com

Vysis
3100 Woodcreek Drive
Downers Grove, IL 60515
(800) 553-7042 FAX: (630) 271-7138
(630) 271-7000
http://www.vysis.com

W&H Dentalwerk Bürmoos
P.O. Box 1
A-5111 Bürmoos, Austria
(43) 6274-6236-0
FAX: (43) 6274-6236-55
http://www.wnhdent.com

Wako BioProducts
See Wako Chemicals USA

Wako Chemicals USA
1600 Bellwood Road
Richmond, VA 23237
(800) 992-9256 FAX: (804) 271-7791
(804) 271-7677
http://www.wakousa.com

Wako Pure Chemicals
1-2, Doshomachi 3-chome
Chuo-ku, Osaka 540-8605, Japan
81-6-6203-3741 FAX: 81-6-6222-1203
http://www.wako-chem.co.jp/egaiyo/index.htm

Wallac
See Perkin-Elmer

Wallac
A Division of Perkin-Elmer
3985 Eastern Road
Norton, OH 44203
(800) 321-9632 FAX: (330) 825-8520
(330) 825-4525
http://www.wallac.com

Waring Products
283 Main Street
New Hartford, CT 06057
(800) 348-7195 FAX: (860) 738-9203
(860) 379-0731
http://www.waringproducts.com

Warner Instrument
1141 Dixwell Avenue
Hamden, CT 06514
(800) 599-4203 FAX: (203) 776-1278
(203) 776-0664
http://www.warnerinstrument.com

Warner-Lambert
Parke-Davis
201 Tabor Road
Morris Plains, NJ 07950
(973) 540-2000 FAX: (973) 540-3761
http://www.warner-lambert.com

Washington University Machine Shop
615 South Taylor
St. Louis, MO 63310
(314) 362-6186 FAX: (314) 362-6184

Waters Chromatography
34 Maple Street
Milford, MA 01757
(800) 252-HPLC FAX: (508) 478-1990
(508) 478-2000
http://www.waters.com

Watlow
12001 Lackland Road
St. Louis, MO 63146
(314) 426-7431 FAX: (314) 447-8770
http://www.watlow.com

Watson-Marlow
220 Ballardvale Street
Wilmington, MA 01887
(978) 658-6168 FAX: (978) 988 0828
http://www.watson-marlow.co.uk

Waukesha Fluid Handling
611 Sugar Creek Road
Delavan, WI 53115
(800) 252-5200 FAX: (800) 252-5012
(414) 728-1900 FAX: (414) 728-4608
http://www.waukesha-cb.com

WaveMetrics
P.O. Box 2088
Lake Oswego, OR 97035
(503) 620-3001 FAX: (503) 620-6754
http://www.wavemetrics.com

Weather Measure
P.O. Box 41257
Sacramento, CA 95641
(916) 481-7565

Weber Scientific
2732 Kuser Road
Hamilton, NJ 08691
(800) FAT-TEST FAX: (609) 584-8388
(609) 584-7677
http://www.weberscientific.com

Weck, Edward & Company
1 Weck Drive
Research Triangle Park, NC 27709
(919) 544-8000

Wellcome Diagnostics
See Burroughs Wellcome

Wellington Laboratories
398 Laird Road
Guelph, Ontario
N1G 3X7 Canada
(800) 578-6985 FAX: (519) 822-2849
http://www.well-labs.com

Wesbart Engineering
Daux Road
Billingshurst, West Sussex
RH14 9EZ, UK
(44) 1-403-782738
FAX: (44) 1-403-784180
http://www.wesbart.co.uk

Whatman
9 Bridewell Place
Clifton, NJ 07014
(800) 631-7290 FAX: (973) 773-3991
(973) 773-5800
http://www.whatman.com

Wheaton Science Products
1501 North 10th Street
Millville, NJ 08332
(800) 225-1437 FAX: (800) 368-3108
(856) 825-1100 FAX: (856) 825-1368
http://www.algroupwheaton.com

Whittaker Bioproducts
See BioWhittaker

Wild Heerbrugg
Juerg Dedual Gaebrisstrasse 8 CH
9056 Gais, Switzerland
(41) 71-793-2723
FAX: (41) 71-726-5957
http://www.homepage.swissonline.net/dedual/wild_heerbrugg

Willy A. Bachofen AG Maschinenfabrik
Utengasse 15/17
CH4005 Basel, Switzerland
(41) 61-681-5151
FAX: (41) 61-681-5058
http://www.wab.ch

Winthrop
See Sterling Winthrop

Wolfram Research
100 Trade Center Drive
Champaign, IL 61820
(800) 965-3726 FAX: (217) 398-0747
(217) 398-0700
http://www.wolfram.com

World Health Organization
Microbiology and Immunology Support
20 Avenue Appia
1211 Geneva 27, Switzerland
(41-22) 791-2602
FAX: (41-22) 791-0746
http://www.who.org

World Precision Instruments
175 Sarasota Center Boulevard
International Trade Center
Sarasota, FL 34240
(941) 371-1003 FAX: (941) 377-5428
http://www.wpiinc.com

Worthington Biochemical
Halls Mill Road
Freehold, NJ 07728
(800) 445-9603 FAX: (800) 368-3108
(732) 462-3838 FAX: (732) 308-4453
http://www.worthington-biochem.com

WPI
See World Precision Instruments

Wyeth-Ayerst
2 Esterbrook Lane
Cherry Hill, NJ 08003
(800) 568-9938 FAX: (858) 424-8747
(858) 424-3700

Wyeth-Ayerst Laboratories
P.O. Box 1773
Paoli, PA 19301
(800) 666-7248 FAX: (610) 889-9669
(610) 644-8000
http://www.ahp.com

Xenotech
3800 Cambridge Street
Kansas City, KS 66103
(913) 588-7930 FAX: (913) 588-7572
http://www.xenotechllc.com

Xeragon
19300 Germantown Road
Germantown, MD 20874
(240) 686-7860 FAX: (240)686-7861
http://www.xeragon.com

Xillix Technologies
300-13775 Commerce Parkway
Richmond, British Columbia
V6V 2V4 Canada
(800) 665-2236 FAX: (604) 278-3356
(604) 278-5000
http://www.xillix.com

Xomed Surgical Products
6743 Southpoint Drive N
Jacksonville, FL 32216
(800) 874-5797 FAX: (800) 678-3995
(904) 296-9600 FAX: (904) 296-9666
http://www.xomed.com

Yakult Honsha
1-19, Higashi-Shinbashi 1-chome
Minato-ku Tokyo 105-8660, Japan
81-3-3574-8960

Yamasa Shoyu
23-8 Nihonbashi Kakigaracho
1-chome, Chuoku
Tokyo, 103 Japan
(81) 3-479 22 0095
FAX: (81) 3-479 22 3435

Yeast Genetic Stock Center
See ATCC

Yellow Spring Instruments
See YSI

YMC
YMC Karasuma-Gojo Building
284 Daigo-Cho, Karasuma Nisihiirr
Gojo-dori Shimogyo-ku
Kyoto, 600-8106, Japan
(81) 75-342-4567
FAX: (81) 75-342-4568
http://www.ymc.co.jp

YSI
1725-1700 Brannum Lane
Yellow Springs, OH 45387
(800) 765-9744 FAX: (937) 767-9353
(937) 767-7241
http://www.ysi.com

Zeneca/CRB
See AstraZeneca
(800) 327-0125 FAX: (800) 321-4745

Zivic-Miller Laboratories
178 Toll Gate Road
Zelienople, PA 16063
(800) 422-LABS FAX: (724) 452-4506
(800) MBM-RATS FAX: (724) 452-5200
http://zivicmiller.com

Zymark
Zymark Center
Hopkinton, MA 01748
(508) 435-9500 FAX: (508) 435-3439
http://www.zymark.com

Zymed Laboratories
458 Carlton Court
South San Francisco, CA 94080
(800) 874-4494 FAX: (650) 871-4499
(650) 871-4494
http://www.zymed.com

Zymo Research
625 W. Katella Avenue, Suite 30
Orange, CA 92867
(888) 882-9682 FAX: (714) 288-9643
(714) 288-9682
http://www.zymor.com

Zynaxis Cell Science
See ChiRex Cauldron

参考文献

Abramowitz, M. 1993. Fluorescence Microscopy: The Essentials. Olympus-America, New York.

Ackers, G.K. 1970. Analytical gel chromatography of proteins. *Adv. Protein Chem.* 24:343-446.

Adam, S.A., Sterne-Marr, R., and Gerace, L. 1990. Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors. *J. Cell Biol.* 111:807-816.

Akins, R.E. and Tuan, R.S. 1992. Measurement of protein in 20 seconds using a microwave BCA assay. *Biotechniques* 12:496-499.

Akiyama, S.K., Yamada, S., Chen, W.-T., and Yamada, K. 1989. Analysis of fibronectin receptor function with monoclonal antibodies: Roles in cell adhesion, migration, matrix assembly, and cytoskeletal organization. *J. Cell Biol.* 109:863-875.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J.D. 1994. Molecular Biology of the Cell, 3rd ed. Garland Publishing, New York.

Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, N., Roberts, K., and Walter, P. 2003. Essential Cell Biology. 2nd ed., Garland Publishing, New York.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. 2002. Molecular Biology of the Cell. 4th ed. Garland Publishing, New York.

Albini, A., Iwamoto, Y., Kleinman, H.K., Martin, G.R., Aaronson, S.A., Kozlowski, J.M., and McEwan, R.N. 1987. A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res.* 47:3239-3245.

Anand, R. and Southern, E.M. 1990. Pulsed field gel electrophoresis. *In* Gel Electrophoresis of Nucleic Acid: A Practical Approach, 2nd ed. (D. Rickwood and B.D. Hames, eds.) pp. 101-123. IRL Press, Oxford.

Andrews, A.T. 1986. Electrophoresis: Theory, Techniques and Biochemical and Clinical Applications, 2nd ed. Oxford University Press, New York.

Applied Biosystems. 1989. User Bulletin Issue 11, Model No. 370. Applied Biosystems, Foster City, Calif.

Ashford, A.J., Anderson, S.S.L., and Hyman, A.A. 1998. Preparation of tubulin from bovine brain. *In* Cell Biology: A Laboratory Handbook, 2nd ed. (J.E. Celis, ed.) Vol. 2, pp. 205-212. Academic Press, San Diego.

Aslam, M. and Dent, A. 1998. Bioconjugation: Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences. Macmillan Reference, London.

Axis-Shield. 2000. Types of centrifugal separations. *In* Axis-Shield Density Gradient Media Catalog, pp. 13-29. Axis-Shield, Oslo, Norway; Life Technologies, Grand Island, N.Y.; Accurate Chemicals, Westbury, N.Y.

Babst, M., Wendland, B., Estepa, E.J., and Emr, S.D. 1998. The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *EMBO J.* 17:2982-2993.

Bacallao, R., Kiai, K., and Jesaitis, L. 1995. Guiding principles of specimen preservation for confocal fluorescence microscopy. *In* Handbook of Biological Confocal Microscopy, 2nd ed. (J. Pawley, ed.) pp. 311-326. Plenum, New York.

Baggiolini, M. 1998. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392:565-569.

Bagwell, B.C. 1993. Theoretical aspects of flow cytometry data analysis. *In* Clinical Flow Cytometry. Principles and Application (K.D. Bauer, R.E. Duque, and T.V. Shankey, eds.) pp. 41-61. Williams & Wilkins, Baltimore.

Bailey, G.S. 1994. Labeling of peptides and proteins by radioiodination. *In* Methods in Molecular Biology, Vol. 32 (J.M. Walker, ed.) pp. 441-448. Humana Press, Totowa, N.J.

Balch, W.E. and Rothman, J.E. 1985. Characterization of protein transport between successive compartments of the Golgi apparatus: Asymmetric properties of donor and acceptor activities in cell-free systems. *Arch. Biochem. Biophys.* 240:413-425.

Barkley, W.E. and Richardson, J.H. 1994. Laboratory safety. *In* Methods for General and Molecular Bacteriology, 2nd ed. (P.E. Gerhardt, R.G.E. Murray, W.A. Wood, and N.R. Krieg, eds.) pp. 715-734. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Barnes, D.W. 1987. Serum-free animal cell culture. *BioTechniques* 5:534-541.

Barnhart, E.R. 1990. Physicians' Desk Reference. Medical Economics Company, Oradell, N.J.

Barth, A.I.M., Nathke, I.S., and Nelson, W.J. 1997. Cadherins, catenins and APC protein: Interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:683-690.

Beckers, C.J.M., Keller, D.S., and Balch, W.E. 1987. Semi-intact cells permeable to macromolecules: Use in reconstitution of protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *Cell* 50:523-534.

Beckler, G.S., Thompson, D., and Van Oosbree, T. 1995. In vitro translation using rabbit reticulocyte lysate. *Methods Mol. Biol.* 37:215-232.

Bell, C.W., Fraser, C., Sale, W.S., Tang, W.-J.Y., and Gibbons, I.R. 1982. Preparation and purification of dynein. *J. Methods Cell Biol.* 24:373-397.

Bellamy, C.O.C., Malcomson, R.D.G., Harrison, D.J., and Wyllie, A.H. 1995. Cell death in health and disease: The biology and regulation of apoptosis. *Semin. Cancer Biol.* 6:3-16.

Benaroch, P., Yilla, M., Raposo, G., Ito, K., Miwa, K., Geuze, H.J., and Ploegh, H.L. 1995. How MHC Class II molecules reach the endocytic pathway. *EMBO J.* 14:37-49.

Berg, T., Kindberg, G.M., Ford, T., and Blomhoff, R. 1985. Intracellular transport of asialoglycoproteins in rat hepatocytes. Evidence for two subpopulations of lysosomes. *Exp. Cell Res.* 161:285-296

Beyer, R.E. 1983. A rapid biuret assay for protein of whole fatty tissues. *Anal. Biochem.* 129:483-485.

Birkedal-Hansen, H. 1987. Catabolism and turnover of collagens: Collagenases. *Methods Enzymol.* 144:140-171.

Birnie, G.D. 1978. Isolation of nuclei from animal cells in culture. *Methods Cell Biol.* 17:13-26.

Bjerrum, O.J. and Schafer-Nielsen, C. 1986. Buffer systems and transfer parameters for semidry electroblotting with a horizontal apparatus. *In* Electrophoresis '86 (M.J. Dunn, ed.) pp. 315-327. VCH Publishers, Deerfield Beach, Fla.

Blobel, G. and Dobberstein, B. 1975. Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J. Cell Biol.* 67:852-862.

Block, S.S. 1983. Disinfection, Sterilization, and Preservation, 3rd ed. Lea & Febiger, Philadelphia.

Blum, H., Beier, H., and Gross, H.J. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8:93-99.

Boevink, P., Santa Cruz, S., Hawes, C., Harris, N., and Oparka, K.J. 1996. Virus-mediated delivery of the green fluorescent protein to the endoplasmic reticulum of plant cells. *Plant J.* 10:935-941.

Boevink, P., Oparka, K., Santa Cruz, S., Martin, B., Betteridge, A., and Hawes, C. 1998. Stacks on tracks: The plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network. *Plant J.* 15:441-447.

Boyden, S.V. 1962. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.* 115:453-466.

Boyum, A. 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Invest.* 21(Suppl. 97):107-111.

Brelje, T.C., Wessendorf, M.W., and Sorenson, R.L. 1993. Multicolor laser scanning confocal immunofluorescence microscopy: Practical applications and limitations. *In* Cell Biological Applications of Confocal Microscopy (B. Matsumoto, ed.) pp. 98-182. Academic Press, San Diego.

Brock, T.D. 1983. Membrane Filtration: A User's Guide and Reference Manual. Science Tech, Inc., Madison, Wis.

Brown, A.J., Jarvis, K., and Hyland, K. 1989. Protein measurement using bicinchoninic acid: Elimination of interfering substances. *Anal. Biochem.* 180:136-139.

Brown, D.A., and London, E. 1997. Structure of detergent-resistant membrane domains: Does phase separation occur in biological membranes? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240:1-7.

Brown, W.J. and Farquhar, M.G. 1989. Immunoperoxidase methods for the localization of antigens in cultured cells and tissue sections by electron microscopy. *Methods Cell Biol.* 31:553-569.

Brown, W.J., Constantinescu, E., and Farquhar, M.G. 1984. Redistribution of mannose-6 phosphate receptors induced by tunicamycin and chloroquine. *J. Cell Biol.* 99:320-326.

Buchner, J., Renner, M., Lilie, H., Hinz, H.-J., Jaeniche, R., Kiefhaler, T., and Rudolph, R. 1991. Alternatively folded states of an immunoglobulin. *Biochemistry* 30:6922-6929.

Budavari, S., O'Neil, M.J., Smith, A., Heckelman, P.E., and Kinneary, J.F. (eds.) 1996. The Merck Index. Merck Research Laboratories Division of Merck & Co., Whitehouse Station, N.J.

Buettner, H.M., Lauffenburger, D.A., and Zigmond, S.H. 1989. Measurement of leukocyte motility and chemotaxis parameters with Millipore filter assay. *J. Immunol. Methods* 123:25-37.

Burry, R.W., Vandre, D.D., and Hayes, D.M. 1992. Silver enhancement of gold antibody probes in pre-embedding electron microscopic immunocytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 40:1849-1856.

Burton, K. and Taylor, D. 1997. Traction forces of cytokinesis measured with optically modified elastic substrata. *Nature* 385:450-454.

Campbell, J.S., Seger, R., Graves, J.D., Graves, L.M., Jensen, A.M., and Krebs, E.G. 1995. The MAP kinase cascade. *Recent Prog. Horm. Res.* 50:131-159.

Casey, P.J. and Buss, J.E. 1995. Lipid modification of proteins. *Methods Enzymol.*, Vol. 250.

Cereghino, J.L., Marcusson, E.G., and Emr, S.D. 1995. The cytoplasmic tail domain of the vacuolar protein sorting receptor Vps10p and a subset of *VPS* gene products regulate receptor stability, function, and localization. *Mol. Biol. Cell* 6:1089-1102.

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., and Prasher, D.C. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263:802-805.

Chamberlain, J.P. 1979. Fluorographic detection of radioactivity in polyacrylamide gels with the water-soluble fluor, sodium salicylate. *Anal. Biochem.* 98:132-135.

Chatigny, M.A. 1986. Primary barriers. *In* Laboratory Safety: Principles and Practices (B.M. Miller, D.H.M. Groschel, J.H. Richardson, D.Vesley, J.R. Songer, R.D. Housewright, and W.E. Barkley, eds.) pp. 144-163. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Chemical Rubber Company. 1975. CRC Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, Physical and Chemical Data, 3d ed., Vol. 1. CRC Press, Boca Raton, Fla.

Chen, L.B. 1989. Fluorescent labeling of mitochondria. *Methods Cell Biol.* 29:103-123.

Chen, R.F. 1990. Fluorescence of proteins and peptides. *In* Practical Fluorescence, 2nd ed. (G.G. Guilbault, ed.) pp. 575-682. Marcel Dekker, Inc., New York.

Chirgwin, J.J., Przbyla, A.E., MacDonald, R.J., and Rutter, W.J. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18:5294-5299.

Choi, J.K., Na, D.S., Hong, H.Y., Choi, D.K., Yoon, S.H., and Yoo, G.S. 1996. A fast and sensitive Coomassie blue staining for proteins in polyacrylamide gels using ion-pairing agent. *Anal. Lett.* 29:1517-1525.

Chui, D., Oh-Eda, M., Liao, Y.-F., Panneerselvam, K., Lal, A., Marek, K.W., Freeze, H.H., Moremen, K.W., Fukuda, M.N., and Marth, J.D. 1997. Alpha-mannosidase-II deficiency results in dyserythropoiesis and unveils an alternate pathway in oligosaccharide biosynthesis. *Cell* 90:157-167.

Chung, A.E., Estes, L.E., Shinozuka, H., Braginski, J., Lorz, C., and Chung, C.A. 1977. Morphological and biochemical observations on cells derived from the in vitro differentiation of the embryonal carcinoma cell line PCC4-F. *Cancer Res.* 37:2072-2081.

Coligan, J.E., Gates, F.T. III, Kimball, E.S., and Maloy, W.L. 1983. Radiochemical sequence analysis of metabolically labeled proteins. *Methods Enzymol.* 91:413-434.

Collins, K., Sellers, J.R., and Matsudaira, P. 1990. Calmodulin dissociation regulates brush border myosin I (110-kD calmodulin) mechanochemical activity in vitro. *J. Cell Biol.* 110:1137-1147.

Compton, S.J. and Jones, C.G. 1985. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal. Biochem.* 151:369-374.

Coons, A.H. 1961. The beginnings of immunofluorescence. *J. Immunol.* 87:499-503.

Coue, M., Lombillo, V.A., and McIntosh, J.R. 1991. Microtubule depolymerization promotes particle and chromosome movement in vitro. *J. Cell Biol.* 112:1165-1175.

Craig, L.C. 1967. Techniques for the study of peptides and proteins by dialysis and diffusion. *Methods Enzymol.* 11:870-905.

Crowley, L.V. 1969. Interference with certain chemical analyses caused by dextran. *Am. J. Clin. Pathol.* 51:425.

Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A., and Tsien, R.Y. 1995. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem. Sci.* 20:448-455.

Cubitt, A.B., Woolenweber, L.A., and Heim, R. 1999. Understanding structure-function relationships in the *Aequoria victoria green fluorescent protein. In* Green Fluorescent Proteins (K.F. Sullivan and S.A. Kay, eds.) pp. 19-30. Academic Press, San Diego.

Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D.R., and Yamada, K.M. 2001. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* 294:1708-1712.

Dabora, S.L. and Sheetz, M.P. 1988. Microtubule dependent formation of a tubular vesicular network with characteristics of the endoplasmic reticulum from cultured cell extracts. *Cell* 54:27-35.

Darzynkiewicz, Z., Robinson, J.P., and Crisstman, H.A. (eds.) 1994. *Methods Cell Biol.*, Vols. 41 and 42 (Flow Cytometry: Part A and Part B, 2nd ed.). Academic Press, San Diego.

Dasso, M. and Newport, J.W. 1990. Completion of DNA replication is monitored by a feedback system that controls the initiation of mitosis in vitro: Studies in *Xenopus*. *Cell* 61:811-823.

Dautry-Varsat, A., Ciechanover, A., and Lodish, H.F. 1983. pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:2258-262.

Dawson, R.M.C., Elliot, D.C., Elliott, W.H., and Jones, K.M. (eds.) 1986. Data for Biochemical Research. Alden Press, London.

Deerinck, T.J., Martone, M.E., Lev-Ram, V., Green, D.P., Tsien, R.Y., Spector, D.L., Huang, S., and Ellisman, M.H. 1994. Fluorescence photooxidation with eosin: A method for high resolution immunolocalization and in situ hybridization detection for light and electron microscopy. *J. Cell Biol.* 126:901-910.

de Haen, C. 1987. Molecular weight standards for calibration of gel filtration and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis: Ferritin and apoferritin. *Anal. Biochem.* 166:235-245.

Desai, D., Wessling, H.C., Fisher, R.P., and Morgan, D.O. 1995. Effects of phosphorylation by CAK on cyclin binding by CDC2 and CDK2. *Mol. Cell. Biol.* 15:345-350.

Dignam, J.D., Lebovitz, R.M., and Roeder, R.G. 1983. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucl. Acids Res.* 11:1475-1489.

Dobrota, M. and Hinton, R. 1992. Conditions for density gradient separations. *In* Preparative Centrifugation: A Practical Approach (D. Rickwood, ed.) pp. 77-142. IRL Press, Oxford.

Donaldson, J.G., Lippincott-Schwartz, J., and Klausner, R.D. 1991. Guanine nucleotides modulate the effects of brefeldin A in semipermeable cells: Regulation of the association of a 110-kD peripheral membrane protein with the Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* 112:579-588.

Donovan, J. and Brown, P. 1995. Animal health assurance. *In* Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach, and W. Strober, eds.) pp. 1.1.1-1.1.3. John Wiley & Sons, New York.

Doumas, B.T., Bayse, D.D., and Carter, R.J. 1981. A candidate reference method for determination of total protein in serum. *Clin. Chem.* 27:1642.

Drubin, D.G. and Nelson, W.J. 1996. Origins of cell polarity. *Cell* 84:335-344.

Dunphy, W.G. (ed.) 1997. Methods Enzymol. Vol. 283: Cell Cycle Control. Academic Press, New York.

Eichholtz, T.E., Vossebeld, P., Van Overveld, M., and Ploegh, H.L. 1992. Activation of protein kinase C accelerates internalization of transferrin receptor but not major histocompatibility complex class I molecules, independent of their phosphorylation status. *J. Biol. Chem.* 267:22490-22495.

Elsdale, T. and Bard, J. 1972. Collagen substrate for studies on cell behavior. *J. Cell Biol.* 54:626-637.

Emmert-Buck, M.R., Bonner, R.F., Smith, P.D., Chuaqui, R.F., Zhuang, Z., Goldstein, S.R., Weiss, R.A., and Liotta, L.A. 1996. Laser capture microdissection. *Science* 274:998-1001.

Enari, M., Talanian, R.V., Wong, W.W., and Nagata, S. 1996. Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during fas-mediated apoptosis. *Nature* 380:723-726.

Engvall, E. and Ruoslahti, E. 1977. Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen. *Int. J. Cancer* 20:1-5.

Evans, W.H. 1992. Isolation and characterization of membranes and cell organelles. *In* Preparative Centrifugation: A Practical Approach (D. Rickwood, ed) pp. 233-270. IRL Press, Oxford.

Evans, L., Mitchison, T., and Kirschner, M. 1985. Influence of the centrosome on the structure of nucleated microtubules. *J. Cell Biol.* 100:1185-1191.

Fasman, G.D. 1989. Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. CRC Press, Boca Raton, Fla.

Fohr, K.J., Scott, J., Ahnert-Hilger, G., and Gratzl, M. 1989. Characterization of the inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release from permeabilized endocrine cells and its inhibition by decavanadate and *p*-hydroxymercuribenzoate. *Biochem. J.* 262:83-89.

Freifelder, D. 1982. Physical Biochemistry: Applications to Biochemistry and Molecular Biology 2nd ed. W.H. Freeman, New York.

Freshney, R.I. 1993a. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 3rd ed., pp. 51-69. Wiley-Liss, New York.

Freshney, R.I. 1993b. Contamination. *In* Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 3rd ed., pp 243-252. Wiley-Liss, New York.

Fujiki, Y., Hubbard, A.L., Fowler, S., and Lazarow, P.B. 1982. Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: Application to endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 93:97-102.

Funderud, S., Erikstein, B., Asheim, H., Nustad, K., Stokke, T., Blomhoff, H., Holte, H., and Smeland, E. 1990. Functional properties of $CD19^+$ B lymphocytes positively selected from buffy coats by immunomagnetic separation. *Eur. J. Immunol.* 20:201-206.

Gabay, L., Seger, R., and Shilo, B.Z. 1997. In situ activation pattern of Drosophila EGF receptor pathway during development. *Science* 277:1103-1106.

Galbraith, C. and Sheetz, M. 1997. A new bend on measuring local traction forces: Micromachined substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:9114-9118.

Gallagher, J.T. 1997. Structure-activity relationships of heparan sulfate. *Biochem. Soc. Trans.* 25:1206-1209.

Gaynor, E.C., te Heesen, S., Graham, T.R., Aebi, M., and Emr, S.D. 1994. Signal-mediated retrieval of a membrane protein from the Golgi to the ER in yeast. *J. Cell Biol.* 127:653-665.

Ghosh, M.K. and Hajra, A.K. 1986. A rapid method for the isolation of peroxisomes from rat liver. *Anal. Biochem.* 159:169-174.

Goding, J.W. 1996. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice 3rd ed., Academic Press, San Diego.

Goldstein, L.S.B. and Fyrberg, E.A. 1994. *Drosophila melanogaster*: Practical uses in cell and molecular biology. *Methods Cell Biol.* Vol. 44.

Gospodarowicz, D., Moran, J., Braun, D., and Birdwell, C.R. 1976. Clonal growth of bovine vascular endothelial cells in tissue culture: Fibroblast growth factor as a survival agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73:4120-4124.

Graham, J.M. 1993. The identification of subcellular fractions from mammalian cells. *In* Methods in Molecular Biology, Vol. 19 (J.M. Graham and J.A. Higgins, eds.) pp. 1-18. Humana Press, Totowa, N.J.

Graham, J.M. 1997. Homogenization of cells and tissues. *In* Subcellular Fractionation—A Practical Approach (J.M. Graham and D. Rickwood, eds.) pp. 1-29. Oxford University Press, Oxford.

Graham, J., Ford, T., and Rickwood, D. 1994. The preparation of subcellular organelles from mouse liver in self-generated gradients of iodixanol. *Anal. Biochem.* 220:367-373.

Griffiths, G. 1993. Fine Structure Immunocytochemistry. Springer-Verlag, Heidelberg.

Guthrie, C. and Fink, G.R. (eds.) 1991. Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods Enzymol.* Vol. 194.

Hagel, L. 1989. Gel filtration. *In* Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications (J.C. Janson and L. Ryden, eds.) pp. 63-106. VCH Publishers, New York.

Hall, P.K. and Roberts, R.C. 1978. Physical and chemical properties of human plasma a2-macroglobulin. *Biochem. J.* 171:27-38.

Ham, R.G. 1984. Formulation of basal nutrient media. *In* Cell Culture Methods for Cell Biology, Vol. 1 (D.W. Barnes, D.A. Sirbasku, and G.H. Sato, eds.) pp. 3-21. Alan R. Liss, New York.

Hames, B.D. and Rickwood, D. (eds.) 1990. Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach, 2nd ed. Oxford University Press, New York.

Hardy, R.R. 1986. Purification and characterization of monoclonal antibodies. *In* Handbook of Experimental Immunology, Vol. 1: Immunochemistry (D.M. Weir, ed.) pp. 13.1-13.13. Blackwell Scientific, Oxford.

Harlow, E. and Lane, D. 1988. Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Harris, A., Wild, P., and Stopak, D. 1980. Silicone rubber substrata: A new wrinkle in the study of cell locomotion. *Science* 208:117-118.

Hartwell, L.H. and Kastan, M.B. 1994. Cell cycle control and cancer. *Science* 266:1821-1828.

Hartwell, L.H. and Weinert, T.A. 1989. Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246:629-634.

Haseloff, J., Siemering, K.R., Prasher, D.C., and Hodge, S. 1997. Removal of a cryptic intron and subcellular localisation of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:2122-2127.

Haugland, R.P. 1996a. Introduction to amine modification. *In* Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 6th ed. (M.T.Z. Spence, ed.) p. 12. Molecular Probes, Eugene, Ore. [The 7th edition of this Handbook (1999) is available free on CD-ROM from Molecular Probes and at *www.probes.com*].

Haugland, R. 1996b. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 6th ed. Molecular Probes, Inc. Eugene, Oregon.

Hawkins, B.K. and Honigs. D.E. 1987. A comparison of spectroscopic techniques for protein quantification in aqueous solutions. *Am. Biotechnol. Lab.* 5:26-37.

Hay, R.J., Caputo, J., and Macy, M.L. 1992. ATCC Quality Control Methods for Cell Lines, 2nd ed. American Type Culture Collection, Rockville, Md.

Heald, R., Tournebize, R., Vernos, I., Murray, A., Hyman, T., and Karsenti, E. 1998. In vitro assays for mitotic spindle assembly and function. *In* Cell Biology. A Laboratory Handbook, Vol. 2. (J.E. Celis, ed.) pp. 326-335. Academic Press, San Diego.

Helenius, A. and Simons, K. 1975. Solubilization of membranes by detergents. *Biochim. Biophys. Acta* 415:29-79.

Herman, B. 1998. Fluorescence Microscopy. Bios Scientific Publishing, Oxford, England.

Herman, B. and Jacobson, K. 1990. Optical Microscopy for Biology. Wiley-Liss, New York.

Hermanson, G.T. 1996. Bioconjugate Techniques. Academic Press, San Diego.

Hochstrasser, D.F., Harrington, M.C., Hochstrasser, A.C., Miller, M.J., and Merril, C.R. 1988. Methods for increasing the resolution of two-dimensional protein electrophoresis. *Anal. Biochem.* 173:424-435.

Hoffmann, G. (ed.) 1977. ISCO Tables, 7th ed. ISCO, Lincoln, Neb.

Hoyer, L.W. and Shainoff, J.R. 1980. Factor VIII-related protein circulates in normal human plasma as high molecular weight multimers. *Blood* 55:1056-1059.

Hubbard, A.L. and Ma., A. 1983. Isolation of rat hepatocyte plasma membranes. II. Identification of membrane-associated cytoskeletal proteins. *J. Cell Biol.* 96:230-239.

Hubbard, A.L., Wall, D.A., and Ma, A. 1983. Isolation of rat hepatocyte plasma membranes. I. Presence of the three major domains. *J. Cell Biol.* 96:217-229.

Hubbard, A.L., Bartles, J.R., and Braiterman, L.T. 1985. Identification of rat hepatocyte plasma membrane proteins using monoclonal antibodies. *J. Cell Biol.* 100:1115-1125.

Humphries, M.J., Mould, A.P., and Weston, S.A. 1994. Conjugation of synthetic peptides to carrier proteins for cell adhesion studies. *J. Tissue Culture Methods* 16:239-242.

Hynes, R.O. 1990. Fibronectins. Springer-Verlag, New York.

Inoué, S. and Spring, K.R. 1997. Video Microscopy: The Fundamentals, 2nd ed. Plenum, New York.

Iozzo, R.V. 1998. Matrix proteoglycans: From molecular design to cellular function. *Annu. Rev. Biochem.* 67:609-652.

Jaffe, E.A. 1980. Culture of human endothelial cells. *Transplant. Proc.* 12:49-53.

Jagus, R. 1987. Translation in cell-free systems. *Methods Enzymol.* 152:267-275.

Jalink, K., van Corven, E.J., and Moolenaar, W.H. 1990. Lysophosphatidic acid, but not phosphatidic acid, is a potent Ca^{2+}-mobilizing stimulus for fibroblasts. Evidence for an extracellular site of action. *J. Biol. Chem.* 265:12232-12239.

Johnston, R.F., Pickett, S.C., and Barker, D.L. 1990. Autoradiography using storage phosphor technology. *Electrophoresis* 11:355-360.

Kamakaka, R.T., Tyree, C.M., and Kadonaga. J.T. 1991. Accurate and efficient RNA polymerase II transcription with a soluble nuclear fraction derived from *Drosophila* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:1024-1028.

Kameshita, I. and Fujisawa, H. 1989. In-gel kinase assay. *Anal. Biochem.* 183:139-143.

Kay, R.R., Fraser, D., and Johnston, I.R. 1972. A method for the rapid isolation of nuclear membranes from rat liver. *Eur. J. Biochem.* 30:145-154.

Keller, H.E. 1998. Proper Alignment of the Microscope. *Methods Cell Biol.* 56:135-146.

Keller, R.K. and Touster, O. 1975. Physical and chemical properties of β-glucuronidase from the preputial gland of the female rat. *J. Biol. Chem.* 250:4765-4769.

Kessin, R.H. 2000. *Dictyostelium*: Evolution, Cell Biology, and the Development of Multicellularity. Developmental and Cell Biology Series. Cambridge University Press, Cambridge.

Klausner, R.D., Donaldson, J.G., and Lippincott-Schwartz, J. 1992. Brefeldin A: Insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J. Cell Biol.* 116:1071-1080.

Kleinman, H.K., McGarvey, M.L., Hassell, J.R., Star, V.L., Cannon, F.B., Laurie, G.W., and Martin, G.R. 1986. Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry* 25:312-318.

Kornfeld, R. and Kornfeld, S. 1985. Assembly of asparagine-linked qoligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* 54:631-664.

Kramer, H.R. and Vogel, K.G. 1984. Selective degradation of basement membrane macromolecules by metastatic cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 72:889-899.

Kreis, T.E. 1986. Microinjected antibodies against the cytoplasmic domain of vesicular stomatitis virus glycoprotein block its transport to the cell surface. *EMBO J.* 5:931-941.

Krizek, D.M and Rick, M.E. 2000. A rapid method to visualize von Willebrand factor multimers using agarose gel electrophoresis, immunolocalization, and luminographic detection. *Thrombosis Res.* 97:457-62

Krizman, D.B., Chuaqui, R.F., Meltzer, P.S., Trent, J.M., Duray, P.H., Lineham, W.M., Liotta, L.A., and Emmert-Buck, M.R. 1996. Construction of a representative cDNA library from prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Res.* 56:5380-5381.

Kubota, Y., Kleinman, H.K., Martin, G.R., and Lawley, T.J. 1988. Role of laminin and basement membrane in morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J. Cell Biol.* 107:1589-1598.

Labarca, C. and Paigen, K. 1980. A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal. Biochem.* 102:344-352.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Laskey, R.A. 1980. The use of intensifying screens or organic scintillators for visualizing radioactive molecules resolved by gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* 65:363-371.

Lathe, R. 1985. Synthetic oligonucleotide probes deduced from amino acid sequence data. Theoretical and practical considerations. *J. Mol. Biol.* 183:1-12.

Laskey, R.A. and Mills, A.D. 1975. Quantitative film detection of ^{3}H and ^{14}C in polyacrylamide gels by fluorography. *Eur. J. Biochem.* 56:335-341.

Laskey, R.A. and Mills, A.D. 1977. Enhanced autoradiographic detection of ^{32}P and ^{125}I using intensifying screens and hypersensitized film. *FEBS Lett.* 82:314-316.

Lauffenburger, D.A., Rothman, C., and Zigmond, S.H. 1983. Measurement of leukocyte motility and chemotaxis parameters with a linear under-agarose assay. *J. Immunol.* 131:940-947.

Lederer, C.M., Hollander, J.M., and Perlman, I. (eds.) 1967. Table of Radioisotopes, 6th edition. John Wiley and Sons, New York.

Lee, E.C. 1991. Cytogenetic Analysis of Continuous Cell Lines. *In* The ACT Cytogenetic Laboratory Manual, 2nd ed. (M.J. Barch, ed.) pp. 107-148. Raven Press, New York.

Le Maire, M., Aggerbeck, L.P., Monteilhet, C., Andersen, J.P., and Moller, J.V. 1986. The use of high-performance liquid chromatography for the determination of size and molecular weight of proteins: A caution and a list of membrane proteins suitable as standards. *Anal. Biochem.* 154:525-535.

Le Maire, M., Ghazi, A., Moller, J.V., and Aggerbeck, L.P. 1987. The use of gel chromatography for the determination of sizes and relative molecular masses of proteins. *Biochem. J.* 243:399-404.

Li, L., Aggeler, M.J., Farson, D.A., Hatier, C., Hassell, J.R., and Bissell, M.J. 1986. Influence of a reconstituted basement membrane and its components on casein gene expression and secretion in mouse mammary epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:136-140.

Lide, D.R. 1997. CRC Handbook of Chemistry and Physics, 78th ed. CRC Press, Boca Raton, Fla.

Lin, H.Y., Wells, B.R., Taylor, R.E., and Birkedal-Hansen, H. 1987. Degradation of type I collagen by rat mucosal keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 262:6823-6831.

Lindahl, U., Kusche-Gullberg, M., and Kjellen, L. 1998. Regulated diversity of heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* 273:24979-24982.

Liotta, L.A. 1989. Tumor invasion and metastasis. Role of the extracellular matrix. *Cancer Res.* 46:1-7.

Lipsky, N.G. and Pagano, R.E. 1985a. A vital stain for the Golgi apparatus. *Science* 228:745-747.

Lodish, H., Matsudaira, P., Baltimore, D., Berk, A., and Zipursky, S.L.1999. Molecular Cell Biology, 4th ed. W.H. Freeman and Co., New York.

Loew, L.M. 1998. Measuring membrane potential in single cells with confocal microscopy. *In* Cell Biology: A Laboratory Handbook, 2nd ed. (J. Celis, ed.) vol. 3, pp. 375-379. Academic Press, Orlando, Fla.

Loew, L.M., Tuft, R.A., Carrington, W., and Fay, F.S. 1993. Imaging in five dimensions: Time-dependent membrane potentials in individual mitochondria. *Biophys. J.* 65:2396-2407.

Lotz, M.M, Burdsal, C.A., Erickson, H.P., and McClay, D.R. 1989. Cell adhesion to fibronectin and tenascin: Quantitative measurements of initial binding and subsequent strengthening response. *J. Cell Biol.* 109:1795-1805.

Lundh, S. 1973. Determination of the molecular weight and partial specific volume of human transferrin by means of a new two-stage density gradient equilibrium method. *Int. J. Peptide Protein Res.* 5:304-325.

Luton, F. and Mostov, K.E. 1999. Transduction of basolateral-to-apical signals across epithelial cells: Ligand stimulated transcytosis of the polymeric immunoglobulin receptor requires two signals. *Mol. Biol. Cell* 10:1409-1427.

Marcusson, E.G., Horazdovsky, B.F., Cereghino, J.L., Gharakhanian, E., and Emr, S.D. 1994. The sorting receptor for yeast vacuolar carboxypeptidase Y is encoded by the *VPS10* gene. *Cell* 77:579-586.

Margossian, S.S. and Lowey, S. 1982. Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle. *Methods Enzymol.* 85B:55-71.

Martin, R.G. and Ames, B.N. 1961. A method for determining the sedimentation behavior of enzymes: Application to protein mixtures. *J. Biol. Chem.* 236:1372-1379.

Marzluf, G.A. 1997. Molecular genetics of sulfur assimilation in filamentous fungi and yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* 51:73-96.

Matsumoto, B. (ed.) 1993. Cell Biological Applications of Confocal Microscopy. Academic Press, London.

McCaffery, J.M. and Farquhar, M.G. 1995 Localization of GTPases by indirect immunofluorescence and immunoelectron microscopy. *Methods Enzymol.* 257:259-279.

McClay, D.R., Wessel, G.M., and Marchase, R.B. 1981. Intercellular recognition: Quantitation of initial binding events. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:4975-4979.

McLean, I.W. and Nakane, P.K. 1974. Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new fixative for immunoelectron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 22:1077-1083.

McNeil, P.L. 1989. Incorporation of macromolecules into living cells. *Methods Cell Biol.* 29:153-173.

McNeil, P.L. and Steinhardt, R.A. 1997. Loss, restoration and maintenance of plasma membrane integrity. *J. Cell. Biol.* 137:1-4.

McNeil, P.L., Murphy, R.F., Lanni, F., and Taylor, D.L. 1984. A method for incorporating macromolecules into adherent cells. *J. Cell Biol.* 98:1556-1564.

McPhie, P. 1971. Dialysis. *Methods Enzymol.* 22:23-32.

Mechali, M. and Harland, R.M. 1982. DNA synthesis in a cell-free system from *Xenopus* eggs: Priming and elongation on single-stranded DNA in vitro. *Cell* 30:93-101.

Mellman, I. 1996. Endocytosis and molecular sorting. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12:575-625.

Miller, G. and Lipman, M. 1973. Release of infectious Epstein-Barr virus by transformed marmoset leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70:190-194.

Millero, F.J., Ward, G.K., and Chetirkin, P. 1976. Partial specific volume, expansibility, compressibility, and heat capacity of aqueous lysozyme solutions. *J. Biol. Chem.* 251:4001-4004.

Millipore. 1993. Millipore Direct. Millipore, Bedford, MA.

Moore, M.S. and Blobel, G. 1992. The two steps of nuclear import, targeting to the nuclear envelope and translocation through the nuclear pore, require different cytosolic factors. *Cell* 69:939-950.

Moos, M. 1992. Isolation of proteins for microsequence analysis. *In* Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach, and W. Strober, eds.) pp. 8.7.1-8.7.12. Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, New York.

Morch, M.D., Drugeon, G., Zagorski, W., and Haenni, A.L. 1986. The synthesis of high-molecular-weight proteins in the wheat germ translation system. *Methods Enzymol.* 118:154-164.

Morgan, D.O. 1995. Principles of CDK regulation. *Nature* 374:131-134.

Mosher, D.F., ed. 1989. Fibronectin. Academic Press, New York.

Mostov, K.E., Verges, M., and Altschuler, Y. 2000. Membrane traffic in polarized epithelial cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12:483-490.

Mould, A.P., Akiyama, S.K., and Humphries, M.J. 1996. The inhibitory anti-β1 integrin monoclonal antibody 13 recognises an epitope that is attenuated by ligand occupancy: evidence for allosteric inhibition of integrin function. *J. Biol. Chem.* 271:20365-20374.

Mukherjee, S., Ghosh, R.N., and Maxfield, F. R. 1997. Endocytosis. *Physiol. Rev.* 77:759-803.

Murray, A.W. 1991. Cell cycle extracts. *Methods Cell Biol.* 36:581-605.

Murray, A.W. and Hunt, R.T. 1993. The Cell Cycle. W.H. Freeman, New York.

Murray, A., Solomon, M.J., and Kirschner, M.W. 1989. The role of cyclin synthesis and degradation in the control of MPF activity. *Nature* 339:280-286.

Nascimento, A.A.C., Cheney, R.E., Tauhata, S.B.F., Larson, R.E., and Mooseker, M.S. 1996. Enzymatic characterization and functional domain mapping of brain myosin-V. *J. Biol. Chem.* 271:17561-17569.

Nebenführ, A., Gallagher, L.A., Dunahay, T.G., Frohlick, J.A., Mazurkiewicz, A.M., Meehl, J.B., and Staehelin, L.A. 1999. Stop-and-go movements of plant Golgi stacks are mediated by the acto-myosin system. *Plant Physiol.* 121:1127-1141.

Neefjes, J.J., Stollorz, V., Peters, P.J., Geuze, H.L., and Ploegh, H.L. 1990. The biosynthetic pathway of MHC class II but not class I molecules intersects the endocytic route. *Cell* 61:171-181.

Newmeyer, D.D., Farschon, D.M., and Reed, J.C. 1994. Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts: Inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria. *Cell* 79:353-364.

Nolta, J.A. and Kohn, J.B. 1997. Human hematopoietic cell culture, transduction, and analyses. *In* Current Protocols in Human Genetics (N.C. Dracopoli, J.L. Haines, B.R. Korf, D.T. Moir, C.C. Morton, C.E. Seidman, J.G. Seidman, and D.R. Smith, eds.) pp. 13.7.1-13.7.35. John Wiley & Sons, New York.

Nose, A., Nagafuchi, A., and Takeichi, M. 1988. Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model systems. *Cell* 54:993-1001.

Novikoff, A.B. 1980. DAB cytochemistry: Artifact problems in its current use. *J. Histochem. Cytochem.* 28:1036-1038.

Nycomed Pharma. 1996. Centrifugation techniques II. *In* Excellence in Separations—Density Gradient Media (brochure),

4th ed. Nycomed Pharma AS, Diagnostics, Oslo.

O'Farrell, P.H. 1975. High resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250:4007-4021.

Oh, E.S., Woods, A., and Couchman, J.R. 1997. Syndecan-4 proteoglycan regulates the distribution and activity of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 272:8133-8136.

Oi, V.T. and Herzenberg, L.A. 1980. Immunoglobulin-producing hybrid cell lines. *In* Selected Methods in Cellular Immunology (B.B. Mishell and S.M. Shiigi, eds.) pp. 351-372. W.H. Freeman, New York.

Oliver, T., Lee, J., and Jacobson, K. 1994. Forces exerted by locomoting cells. *Semin. Cell Biol.* 5:139-147.

Oliver, T., Dembo, M., and Jacobson, K. 1995. Traction forces in locomoting cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* 31:225-240.

Oliver, T., Jacobson, K., and Dembo, M. 1998. Design and use of substrata to measure traction forces exerted by cultured cells. *Methods Enzymol.* 298:497-521.

Pandya, A.G., Sontheimer, R.D., Cockerell, C.J., Takashima, A., and Piepkorn, M. 1995. Papulonodular mucinosis associated with systemic lupus erythematosis: Possible mechanisms of increased glycosaminoglycan accumulation. *J. Am. Acad. Dermatol.* 32:199-205.

Pardee, J.D. and Spudich, J.A. 1982. Purification of muscle actin. *Methods Enzymol.* 85:164-181.

Parent, C.A. and Devreotes, P.N. 1999. A cell's sense of direction. *Science 284:765-770.*

Pawley, J. (ed.) 1995. Handbook of Biological Confocal Microscopy, 2nd ed. Plenum, New York.

Perkins, J.J. 1976. Principles and Methods of Sterilization in Health Sciences. Thomas, Springfield, Ill.

Peterson, G.L. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry, et al. Which is more generally applicable? *Anal. Biochem.* 83:346-356.

Peterson, G.L. 1979. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal. Biochem.* 100:201-220.

Pharmacia 1994. Monoclonal Antibody Purification Handbook. Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J.

Pharmacia Biotech. 1996. Gel Filtration Principles and Methods, 6th ed. Lund, Sweden.

Pierce 1995. A Technical Guide to Antibody/Protein Purification. Pierce, Rockford, Ill.

Pierce Chemical. 1999. Protein Assay Technical Handbook. Pierce Chemical Co. Rockford, Ill.

Pines, J. 1995. Cyclins and cyclin-dependent kinases: Theme and variations. *Adv. Cancer Res.* 66:181-212.

Plonne, D., Cartwright, I., Linss, W., Dargel, R., Graham, J.M., and Higgins, J.A. 1999. Separation of the intracellular secretory compartment of rat liver and isolated rat hepatocytes in a single step using self-generating gradients of iodixanol. *Anal. Biochem.* 276:88-96.

Preissner, K.T. 1991. Structure and biological role of vitronectin. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7:275-310.

Presley, J.F., Cole, N.B., Schroer, T.A., and Lippincott-Schwartz, J. 1997. ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* 389:81-85.

Rabinovitch, P.S. 1994. DNA content histogram and cell-cycle analysis. *Methods Cell Biol.* 41:263-296.

Raposo, G., Kleijmeer, M.J., Posthuma, G., Slot, J.W., and Geuze, H.J. 1997. Immunogold labeling of ultrathin cryosections: Application in immunology. *In* Handbook of Experimental Immunology. 5th ed. Vol 4. pp. 208:1-11.

Reinsch, S. and Gonczy, P. 1998. Mechanisms of nuclear positioning. *J. Cell Sci.* 111:2283-2295.

Reinsch, S. and Karsenti, E. 1997. Movement of nuclei along microtubules in *Xenopus* egg extracts. *Curr. Biol.* 7:211-214.

Reisler, E., Haik, Y., and Eisenberg, H. 1977. Bovine serum albumin and aqueous guanidine hydrochloride solutions. Preferential and absolute interactions and comparison with other systems. *Biochemistry 16:197-203.*

Rice, J.E. and Lindsay, J.G. 1997. Subcellular fractionation of mitochondria. *In* Subcellular Fractionation: A Practical Approach (J.M. Graham and D. Rickwood, eds.) pp. 107-142. IRL Press, Oxford.

Rickwood, D. 1984. Centrifugation, A Practical Approach, 2nd ed. IRL Press, Oxford.

Rickwood, D., Messent, A., and Patel, D. 1997. Isolation and characterization of nuclei and nuclear subfractions. *In* Subcellular Fractionation: A Practical Approach (J.M. Graham and D. Rickwood, eds.), pp 71-105. IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

Rieder, S.E. and Emr, S.D. 1997. A novel RING finger protein complex essential for a late step in protein transport to the yeast vacuole. *Mol. Biol. Cell* 8:2307-2327.

Robinson, J.P., Darzynkiewicz, Z., Dean, P.N., Orfao, A., Rabinovitch, P.S., Stewart, C.C., Tanke, H.J., and Wheeless, L.L. 1998. Current Protocols in Cytometry. John Wiley & Sons, New York.

Rose, M.D, Winston, F., and Hieter, P. 1990. Methods in Yeast Genetics, A Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Russ, J. 1995. The Image Processing Handbook. CRC Press, Boca Raton, Fla.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.

Salinovich, O. and Montelaro, R.C. 1986. Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 156:341-347.

Salmon, E.D. and Tran, P. 1998. High resolution video enhanced differential interference contrast microscopy. *Methods Cell Biol.* 56:153-184.

Sano, K., Tanihara, H., Heimark, R.L., Obata, S., Davidson, M., St. John, T., Taketani, S., and Suzuki, S. 1993. Protocadherins: A large family of cadherin-related molecules in central nervous system. *EMBO J.* 12:2249-2256.

Schagger, H. and von Jagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166:368-379.

Schlegel, J., Peters, I., Orrenius, S., Miller, D.K., Thornberry, N.A., Yamin, T.T., and Nicholson, D.W. 1996. CPP32/apopain is a key interleukin 1 beta converting enzyme-like protease involved in fas-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* 271:1841-1844.

Schumachers, G., Xu, S., Bergstresser, P.R., and Takashima, A. 1995. Identity and functional properties of novel skin-derived fibroblast lines (NS series) that support the growth of epidermal-derived dendritic cell lines. *J. Invest. Dermatol.* 105:225-230.

Schwaninger, R., Beckers, C.M.J., and Balch, W.E. 1991. Sequential transport of protein between the endoplasmic reticulum and successive Golgi compartments in semi-intact cells. *J. Biol. Chem.* 266:13055-13063.

Sefton, B.M., Hunter, T., and Beemon, K. 1980. Temperature-sensitive transformation by Rous sarcoma virus and temperature-sensitive protein kinase activity. *J. Virol.* 33:220-229.

Seger, R. and Krebs, E.G. 1995. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 9:726-735.

Sellers, J.R. 1981. Phosphorylation-dependent regulation of *Limulus myosin. J. Biol. Chem.* 256:9274-9278.

Sellers, J.R. and Kachar, B. 1990. Polarity and velocity of sliding filaments: Control of direction by actin and of speed by myosin. *Science* 249:406-408.

Sellers, J.R., Pato, M.D., and Adelstein, R.S. 1981. Reversible phosphorylation of smooth muscle myosin, heavy meromyosin, and platelet myosin. *J. Biol. Chem.* 256:13137-13142.

Serru, V., LeNaour, F., Billard, M., Azorsa, D.O., Lanza, F., Boucheix, C., and Rubinstein, E. 1999. Selective tetraspan-integrin com-

plexes (CD81/$\alpha4\beta1$, CD151/$\alpha3\beta1$, CD151/$\alpha6\beta1$) under conditions disrupting tetraspan interactions. *Biochem. J.* 340:103-111.

Seufferlein, T. and Rozengurt, E. 1994. Lysophosphatidic acid stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, paxillin, and p130: Signaling pathways and cross-talk with platelet-derived growth factor. *J. Biol. Chem.* 269: 9345-9351.

Shainoff, J.R. 1993. Electrophoresis and direct immunoprobing on glyoxal agarose. *In* Advances in Electrophoresis, Vol. 6 (A. Chrambach, M.J. Dunn, and B.J. Radola, eds.) pp. 65-176. VCH Publishers, New York.

Sheehan, M.A., Mills, A.D., Sleeman, A.M., Laskey, R.A., and Blow, J.J. 1988. Steps in the assembly of replication-competent nuclei in a cell-free system from *Xenopus* eggs. *J. Cell Biol.* 106:1-12.

Shleien, B. (ed.) 1987. Radiation Safety Manual for Users of Radioisotopes in Research and Academic Institutions. Nucleon Lectern Associates, Olney, Md.

Shotton, D.M. (ed.) 1993. Electronic Light Microscopy. John Wiley and Sons, New York.

Shpetner, H.S., Paschal, B.M., and Vallee, R.B. 1988. Characterization of the microtubule-activated ATPase of brain cytoplasmic dynein (MAP 1C). *J. Cell Biol.* 107:1001-1009.

Sigma-Aldrich Co. 1998. Cell Culture Catalogue. Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo.

Sims, N.R. 1990. Rapid isolation of metabolically active mitochondria from rat forebrain and subregions using Percoll density gradient centrifugation. *J. Neurochem.* 55:698-705.

Snapp, E.L., Altan, N., and Lippincott-Schwartz, J. 2003. Meauring protein mobility by photobleaching GFP chimeras in living cells. *In* Current Protocols in Cell Biology (J. Bonifacino, M. Dasso, J.B. Harford, J. Lippincott-Schwartz, and K.M. Yamada, eds.) pp. 21.1.1-21.1.23. John Wiley & Sons, Hoboken, N.J.

Sober, H.A. 1970. CRC Handbook of Biochemistry. Selected Data for Molecular Biology, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, Fla.

Sonderegger, P. Lemkin, P.F., Lipkis, L.E., and Nelson, P.G. 1985. Differential modulation of the expression of axonal proteins by non-neuronal cells of the peripheral and central nervous systems. *EMBO J.* 4:1395-1401.

Sorenson, K. and Brodbeck, U. 1986. A sensitive protein assay method using micro-titer plates. *Experientia* 42:161-162.

Springer, T.A. 1996. Immunoprecipitation. *In* Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan, A.M. Kruisbeck, D.H. Margulies, E.M. Shevach, and W. Strober, eds.) pp. 8.3.1-8.3.11. John Wiley & Sons, New York.

Spudich, J.A. (ed.) 1987. *Dictyostelium discoideum*: Molecular Approaches to Cell Biology. *Methods Cell Biol.* Vol. 28.

Steinberg, T.H., Jones, L.J., Haugland, R.P., and Singer, V.L. 1996. SYPRO Orange and SYPRO Red protein gel stains: One-step fluorescent staining of denaturing gels for detection of nanogram levels of protein. *Anal. Biochem.* 239:223-237.

Steinman, R.M., Brodie, S.E., and Cohn, Z.A. 1976. Membrane flow during pinocytosis. *J. Cell Biol.* 68:665-687.

Stoscheck, C.M. 1990. Quantitation of protein. *Methods Enzymol.* 182:50-68.

Suhonen, J., Ray, J., Blomer, U. and Gage, F.H. 1996. Ex vivo and in vivo gene delivery to the brain. *In* Current Protocols in Human Genetics (N.C. Dracopoli, J.L. Haines, B.R. Korf, D.T. Moir, C.C. Morton, C.E. Seidman, J.G. Seidman, and D.R. Smith, eds.) pp. 13.3.1-13.3.24. John Wiley & Sons, New York.

Sussman, M. 1987. Cultivation and synchronous morphogenesis of *Dictyostelium* under controlled experimental conditions. *Methods Cell Biol.* 28:9-29.

Suzuki, S., Sato, K., and Tanihara, H. 1991. Diversity of cadherin family: Evidence for eight new cadherins in nervous tissue. *Cell Regulation* 2:261-270.

Takahashi, A., Alnemri, E.S., Lazebnik, Y.A., Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., Moir, R.D., Goldman, R.D., Poirier, G.G., Kaufmann, S.H., and Earnshaw, W.C. 1996b. Cleavage of lamin A by Mch2α but not CPP32: Multiple ICE-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:8395-8400.

Takeichi, M. 1977. Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J. Cell Biol.* 75:464-474.

Takeichi, M. 1988. The cadherins: Cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development* 102:639-655.

Takeichi, M. 1995. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:619-627.

Tal, M., Silberstein, A., and Nusser, D. 1980. Why does Coomassie Brilliant Blue interact differently with different proteins? *J. Biol. Chem.* 260:9976-9980.

Tarentino, A.L. and Plummer, T.H. Jr. 1994. Enzymatic deglycosylation of asparagine-linked glycans: Purification, properties, and specificity of oligosaccharide-cleaving enzymes from *Flavobacterium meningosepticum*. *Methods Enzymol.* 230:44-57.

Taylor, D.L. and Wang, Y.-L. (eds). 1989. Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture. *Methods Cell Biol.* Vols. 29 and 30.

Terasaki, M. and Reese, T.S. 1992. Characterization of endoplasmic reticulum by co-localization of BiP and dicarbocyanine dyes. *J. Cell Sci.* 101:315-322.

Terasaki, M., Song, J., Wong, J.R., Weiss, M.J., and Chen, L.B. 1984. Localization of endoplasmic reticulum in living and glutaraldehyde fixed cells with fluorescent dyes. *Cell* 38:101-108.

Tokuyasu, K.T. and Maher, P.A. 1987. Immunocytochemical studies of cardiac myofibrillogenesis in early chick embryos. II. Generation of α-actinin dots within titin spots at the time of the first myofibril formation. *J. Cell Biol.* 105:2795-2801.

Traunecker, A., Olivieri, F., and Karjalainen, K. 1991. Myeloma based expression system for production of large mammalian proteins. *Trends Biotechnol.* 9:109-113.

Trybus, K.M. 1994. Regulation of expressed truncated smooth muscle myosins. Role of the essential light chain and tail length. *J. Biol. Chem.* 269:20819-20822.

Umemoto, S. and Sellers, J.R. 1990. Characterization of in vitro motility assays using smooth muscle and cytoplasmic myosins. *J. Biol. Chem.* 265:14864-14869.

U.S. Pharmacopeial Convention. 1995. The U.S. Pharmacopeia XXIII/The National Formulary XVIII. U.S. Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.

Vale, R.D. and Hotani, H. 1988. Formation of membrane networks in vitro by kinesin-driven microtubule movement. *J. Cell Biol.* 107:2233-2241.

Vale, R.D., Reese, T.S., and Sheetz, M.P. 1985. Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* 42:39-50.

Van Holde, K.E. 1975. Sedimentation analysis of proteins. *In* The Proteins, 3rd ed., Vol. 1 (H. Neurath and R.L. Hill, eds.) pp. 225-291. Academic Press, New York.

Van Wart, H.E. and Birkedal-Hansen, H. 1990. The cysteine switch: A principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:5578-5582.

Vesley, D. and Lauer, J. 1986. Decontamination, sterilization, disinfection, and antisepsis in the microbiology laboratory. *In* Laboratory Safety: Principles and Practices (B.M. Miller, D.H.M. Groschel, J.H. Richardson, D. Vesley, J.R. Songer, R.D. Housewright, and W.E. Barkley, eds.) pp. 182-198. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Vlodavsky, I., Liu, G.M., and Gospodarowicz, D. 1980. Morphological appearance, growth behavior and migratory activity of human tumor cells maintained on extracellular matrix vs plastic. *Cell* 19:607-616.

Vlodavsky, I., Bar-Shavit, R., Korner, G., and Fuks, Z. 1993. Extracellular matrix-bound growth factors, enzymes and plasma proteins. *In* Molecular and Cellular Aspects of Basement Membranes (D.H. Rohrbach and R. Timpl, eds.) pp. 327-343. Academic Press, San Diego.

Volkl, A. and Fahimi, H.D. 1985. Isolation and characterization of peroxisomes from the

liver of normal untreated rats. *Eur. J. Biochem.*. 149:257-265.

Wallace, R.B. and Miyada C.G. 1987. Oligonucleotide probes for the screening of recombinant DNA libraries. *In* Methods of Enzymology, Vol. 152: Guide to Molecular Cloning Techniques (S.L. Berger and A.R. Kimmel, eds.) pp. 432-442. Academic Press, San Diego.

Walworth, N.C., Goud, B., Ruohola, H., and Novick, P.J. 1989. Fractionation of yeast organelles. *Methods Cell Biol.* 31:335-356.

Waterman-Storer, C., Gregory, J., Parsons, S., and Salmon, E.D. 1995. Membrane/microtubule tip attachment complexes (TACs) allow the assembly dynamics of plus ends to push and pull membranes into tubulovesicular networks in interphase *Xenopus* egg extracts *J. Cell Biol.* 130:1161-1169.

Waterman-Storer, C.M., Desai, A., Bulinski, J.C., and Salmon, E.D. 1998. Fluorescent speckle microscopy: Visualizing the movement, assembly, and turnover of macromolecular assemblies in living cells. *Curr. Biol.* 8:1227-1230.

Waterman-Storer, C.M., Desai, A., and Salmon, E.D. 1999. Fluorescent speckle microscopy of spindle microtubule assembly and motility in living cells. *Methods Cell Biol.* 61:155-173.

Watters, C. 1978. A one-step biuret assay for protein in the presence of detergent. *Anal. Biochem.* 88:695-698.

Weichselbaum, T.E. 1946. An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. *Am. J. Clin. Pathol.* 16:40.

Wessendorf, M.W. and Brelje, T.C. 1993. Multicolor fluorescence microscopy using the laser-scanning confocal microscope. *Neuroprotocols* 2:121-140.

Wiechelman, K., Braun, R., and Fitzpatrick, J. 1988. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.* 175:231-237.

Wilson, T. (ed.) 1990. Confocal Microscopy. Academic Press, London.

Wilson, T. 1995. The role of the pinhole in confocal imaging system. *In* Handbook of Biological Confocal Microscopy, 2nd ed. (J. Pawley, ed.) pp. 167-182. Plenum, New York.

Xu, S., Ariizumi, K., Caceres-Dittmar, G., Edelbaum, D., Hashimoto, K., Bergstresser, P.R., and Takashima, A. 1995. Successive generation of antigen-presenting, dendritic cell lines from murine epidermis. *J. Immunol.* 154:2697-2705.

Yamada, K.M. and Yamada, S.S. 1990. Isolation of fibronectin receptors. In Receptor Purification (G. Litwack, ed.) pp 435-449. Humana Press. Clifton, NJ.

Yatohgo, T., Izumi, M., Kushiwagi, H., and Hayashi, M. 1988. Novel purification of vitronectin from human plasma by heparin affinity chromatography. *Cell Struct. Funct.* 13:281-292.

Yurchenco, P.D., Ceccarini, C., and Atkinson, P.H. 1978. Labeling complex carbohydrates of animal cells with monosaccharides. *Methods Enzymol.* 50:175-204.

Zernike, F. 1942. Phase contrast: a new method for the microscopic observation of transparent objects. *Physica* 9:686-693.

Zernike, F. 1958. The wave theory of microscope image formation. *In* Concepts in Classical Optics (J. Strong, ed.) pp. 525-536. W.H. Freeman, San Francisco.

Zhivotovsky, B., Gahm, A., Ankarcrona, M., Nicotera, P., and Orrenius, S. 1995. Multiple proteases are involved in thymocyte apoptosis. *Exp. Cell Res.* 221:404-412.

Zinser, E. and Daum, G. 1995. Isolation and biochemical characterization of organelles from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 11:493-536.

索　引

（按汉语拼音排序）

(Q-1759.31)



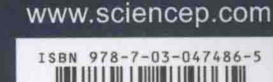
生命科学实验指南系列 · 典藏版



科学出版中心 生物分社
联系电话：010-64012501
E-mail：lifescience@mail.sciencep.com
网址：http://www.lifescience.com.cn

销售分类建议：分子生物技术

www.sciencep.com



赛拉艾芙
生命科学订阅号



ISBN 978-7-03-047486-5

定价（全套）：4500.00元

[General Information]
书名=精编细胞生物学实验指南
作者=（美）J.S.博尼费思农著
页数=838
SS号=14076068
DX号=
出版日期=2016.06
出版社=北京科学出版社